

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
ANDRÉ LUCAS SIMÃO



**DETERMINAÇÃO DE PSICOFARMACOS DE ALTO CONSUMO EM
CORPOS D'ÁGUA DE CURITIBA – PR**

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
ANDRÉ LUCAS SIMÃO

**DETERMINAÇÃO DE PSICOFARMACOS DE ALTO CONSUMO EM
CORPOS D'ÁGUA DE CURITIBA – PR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof Dr. Ricardo Wagner.

Co-Orientadora: Prof^a Dra Eliane Carneiro Gomes

CURITIBA
2016

Simão, André Lucas
Determinação de psicofármacos de alto consumo em corpos d'água de Curitiba – Paraná / André Lucas
Simão - Curitiba, 2016.
73 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Ricardo Wagner
Coorientadora: Professora Dra. Eliane Carneiro Gomes
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Psicofármacos. 2. Fluoxetina. 3. Haloperidol. 4. Rios. 5. Contaminantes. I. Wagner, Ricardo. II. Gomes, Eliane Carneiro. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

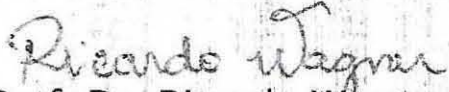
CDD 615.788

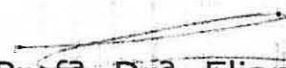
TERMO DE APROVAÇÃO


ANDRÉ LUCAS SIMÃO

Título: "DETERMINAÇÃO DE PSICOFÁRMACOS EM CORPOS D'ÁGUA EM CURITIBA-PR"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Prof. Dr. Ricardo Wagner
Orientador


Profª. Drª. Eliane Carneiro Gomes
Co-orientadora


Prof. Dr. Patricio Guilherme Peralta Zamora
Universidade Federal do Paraná


Profª. Drª. Cristiane da Silva Paula
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 25 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, por sempre estar comigo e me amar, mesmo eu não merecendo.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr. Ricardo Wagner, por não ter desistido de mim e por Deus ter dado a ele muita paciência.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Eliane Carneiro Gomes que com braços abertos me recebeu em seu laboratório e sempre, com muita paciência, se preocupou e fez de tudo para que esse trabalho saísse da melhor forma.

Ao professor Dr. Patrício Zamora que sempre com seu bom humor, não poupou esforços para conseguir materiais para elaboração desse trabalho.

A Bianca do Amaral por sempre abrir mão dos seus afazeres para me orientar de forma espetacular sobre tudo.

Aos meus pais que tanto amo, que são meu porto seguro, referência, amigos, e que nunca pouparam esforços algum para com meus estudos desde que nasci.

Aos meus irmãos que sempre foram meus parceiros.

As minhas tias corujas, que em toda minha vida sempre tiveram orgulho de mim.

A minha linda noiva Samara da Silva, que nesse segundo ano de mestrado me apoiou e me ajudou de muitas formas.

Ao programa de pós de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas que me proporcionou essa oportunidade de crescimento pessoal e intelectual.

A CAPES que me deu condições financeiras de concluir esse trabalho.

“ Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.”

Salmos 23:4

RESUMO

Fármacos são classificados como contaminantes emergentes, e o seu consumo pela população mundial é exorbitante. Pela característica físico-química de suas moléculas, de resistirem a vários tipos de meios, os mesmos poluem rios de forma persistente, impactando o meio, o que causa preocupantes problemas à saúde pública. No Brasil, o lançamento de esgotos, que contém os fármacos, em águas de rios vem sendo o principal disseminante desses poluentes no meio ambiente. Na última década, um determinado nexo científico tem voltado a atenção a esses poluentes, pois não são monitorados e retirados em estações de tratamento de esgoto e de água para consumo de forma eficiente. Neste trabalho avaliou-se a presença de dois psicofármacos, o haloperidol e a fluoxetina em um rio que corta a cidade de Curitiba praticamente de norte a sul. O rio Belém, conhecido por ser muito poluído, principalmente por despejos domésticos foi o objeto desse estudo. O presente trabalho também otimizou e validou um método quantitativo via Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, utilizando coluna Waters XBridge 100mmx 2,1 mm, tamanho de partícula 5µm, e como fase móvel acetonitrila:tampão fosfato 0,01M pH 3,50 (25:75 v:v) assistida por detector por arranjo de diodos (DAD) para o haloperidol e fluorescência para Fluoxetina. Para a extração dos analitos foi utilizada a técnica EFS, com cartuchos Strata X. A validação do método analítico foi realizada a partir de parâmetros já determinados pela ANVISA, INMETRO e por trabalhos que abordam a validação de métodos analíticos. O método se mostrou sensível, apresentando limites de detecção baixos, de 0,14 µg L⁻¹ e 0,27 µg L⁻¹ para o haloperidol e fluoxetina respectivamente, e limites de quantificação de 0,425 µg L⁻¹ e 0,81 µg L⁻¹ para o haloperidol e fluoxetina respectivamente. As amostras de água do rio Belém foram analisadas de duas formas, dopadas com padrão grau analítico, e não dopadas com padrão todas em triplicata. Em nenhuma das amostras não dopadas com padrão apresentaram concentrações suficientes para que o método detectasse os analitos. O efeito de matriz apresentou forte interferência nas análises, o que impossibilitou também as análises de algumas das amostras dopadas com padrão.

Palavras chave: Psicofármacos, fluoxetina, haloperidol, rios, contaminantes.

ABSTRACT

The worldwide consumption of drugs is enormous and they are already classified as emerging contaminants. Owing its physical-chemical characteristics, these molecules can resist to a range of conditions and thus pollute rivers, affecting the environment and causing public health problems. In Brazil, sewage containing drugs are discharge into rivers and this has been the main cause of environment pollution. In the past decade, these pollutants have caught the attention of researchers, since they are neither monitored nor efficiently removed in wastewater treatment plants. In the present work we evaluated the presence of two psychiatric drugs (haloperidol and fluoxetine) on a Curitiba/PR river (Belem), which crosses the city from north to south and is polluted mainly by household waste. A quantitative method via liquid chromatography of high efficiency using column Waters XBridge 100mmx 2.1 mm, 5µm particle size, and mobile phase of acetonitrile: 0.01M phosphate buffer pH 3.50 (25:75 v:v) with detector diode array (DAD) for haloperidol and fluorescence to fluoxetine was also optimized and validated. For analytes extraction, EFS technique with Strata cartridges X was employed. The validation of the analytical method was based on pre-determined parameters by ANVISA, INMETRO and other papers on analytical validation. The method was sensitive since the detection limits were low ($0.14 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.27 \mu\text{g L}^{-1}$ for haloperidol and fluoxetine, respectively). Quantification limits were $0.425 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.81 \mu\text{g L}^{-1}$ for haloperidol and fluoxetine, respectively. Water samples from Belem river were analyzed in triplicate and divided two ways: doped and not doped with standard. Any of the undoped samples showed sufficient concentration for the method to detect the analytes. The matrix effect exhibited strong interference in the analysis, which did not allow the assessment of some of the samples containing the standard solution.

Key words: Psychiatric drugs, fluoxetine, haloperidol, river, contaminants

LISTA DE ABREVIATÖES

ACN - Acetonitrila

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C18 - Octadecil

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD - Detector por Arranjo de Diodos

EFS - Extração em fase sólida

ETE - Estação de Tratamento de Esgoto

FE - Fase Estacionária

FL - Detector por Fluorescência

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade.

LD - Limite de detecção

LQ - Limite de quantificação

POPs - Poluentes orgânicos persistentes

SANEPAR - Companhia de Saneamento do Paraná

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Trabalhos publicados na literatura envolvendo a detecção e quantificação de resíduos de fármacos no meio ambiente.....	21
TABELA 2. Dados cromatográficos da literatura para a determinação de fluoxetina e haloperidol.....	27
TABELA 3. Coordenadas geográficas dos 3 pontos de coleta.....	34
TABELA 4. Condições empregadas na avaliação da influência do pH na extração em fase sólida.....	43
TABELA 5. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^3 testados para a recuperação de fluoxetina e haloperidol em água acidificada pH 4.00, empregando cartuchos Strata X.....	44
TABELA 6. Melhores resultados para obtenção da separação dos analitos...	45
TABELA 7. LD e LQ que foram calculados.....	50
TABELA 8. Limites de detecção e quantificação encontrados para o método proposto.....	50
TABELA 9. Coeficiente de variação referente às injeções de triplicatas de padrões de 50, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ no mesmo dia.....	51
TABELA 10. Coeficiente de variação referente às injeções de triplicatas de padrões de 50, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em três dias diferentes.....	52
TABELA 11. Recuperações obtidas e o coeficiente de variação referente às injeções de triplicatas de padrões de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$	53
TABELA 12. Áreas médias obtidas e o Coeficiente de Variação referente às injeções de triplicatas dos padrões.....	53
TABELA 13. Recuperação dos cartuchos StrataX (500 mg, 3 mL) em diferentes valores de pH.....	54

TABELA 14: Efeitos do solvente de eluição ($S_{\text{eluição}}$), do volume da amostra (V_{amostra}) e da concentração (C) na recuperação da fluoxetina e haloperidol....	54
TABELA 15. Efeitos principais e de interação entre os fatores otimizados pelo planejamento fatorial 2^3	55
TABELA 16. Recuperações encontradas na otimização do volume de reconstituição.....	58
TABELA 17. Recuperação dos fármacos em amostra contendo adição de padrão da primeira coleta nos 3 pontos do rio Belém.....	59
TABELA 18. Recuperação dos fármacos em amostra contendo adição de padrão da segunda coleta nos 3 pontos do rio Belém.....	60
TABELA 19. Recuperação dos fármacos em amostra contendo adição de padrão da terceira coleta nos 3 pontos do rio Belém.....	60
TABELA 20. Resultados obtidos na primeira coleta do rio Belém.....	61
TABELA 21. Resultados obtidos na segunda coleta do rio Belém.....	61
TABELA 22. Resultados obtidos na terceira coleta do rio Belém.....	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Possíveis rotas de contaminação por fármacos no meio ambiente.....	20
FIGURA 2. Molécula da Fluoxetina.....	22
FIGURA 3. Molécula do Haloperidol.....	24
FIGURA 4. Localização da sub-bacia hidrográfica do rio Belém.....	29
FIGURA 5. Foto do primeiro ponto de coleta próximo a nascente do Rio Belém.....	35
FIGURA 6. Foto do Segundo ponto de coleta.....	36
FIGURA 7. Foto do Terceiro ponto de coleta	37
FIGURA 8. Cromatograma apresentando o tempo de retenção da Fluoxetina.....	46
FIGURA 9. Cromatograma demonstrando o tempo de retenção do Haloperidol.....	46
FIGURA 10. Curva analítica da Fluoxetina.....	47
FIGURA 11. Cromatogramas sobrepostos das diferentes concentrações do padrão de Fluoxetina.....	48
FIGURA 12. Curva analítica do Haloperidol.....	48
FIGURA 13. Cromatogramas sobrepostos das diferentes concentrações do padrão de Fluoxetina.....	49
FIGURA 14. Interpretação geométrica dos efeitos significativos do planejamento 2^3 para os resultados obtidos das recuperações do Haloperidol.....	56
FIGURA 15. Interpretação geométrica dos efeitos significativos do planejamento 2^3 para os resultados obtidos das recuperações da Fluoxetina..	57

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Fármacos emergentes mais comuns como contaminantes.....	17
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVO GERAL	12
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 ÁGUA E POLUIÇÃO	13
2.2 FÁRMACOS	14
2.3 FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES AMBIENTAIS EMERGENTES	15
2.4 FÁRMACOS PSICOTRÓPICOS	17
2.5 OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE	19
2.6 FLUOXETINA COMO POLUENTE	22
2.7 HALOPERIDOL	24
2.8 DETERMINAÇÃO DE MICROPOLUENTES POR ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	25
2.9 RIO BELÉM	27
2.10 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS)	29
2.11 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	30
2.11.1 Curva analítica e linearidade	31
2.11.2 Limite de quantificação e limite de detecção	32
2.11.3 Exatidão	32
2.11.4 Precisão	33
3. MATERIAL E METODOS	34
3.1 LOCAL DE ESTUDO	34
3.2 AMOSTRAGEM	37
3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	37
3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	38
3.5 FÁRMACOS ESCOLHIDOS	38
3.6 PADRÕES E REAGENTES	39
3.7 PREPARO DE SOLUÇÕES	39
3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO E DE EXTRAÇÃO DO HALOPERIDOL E FLUOXETINA	40
3.9 LINEARIDADE	40
3.10 LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO (LD)	41
3.11 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO (LQ)	42
3.12 PRECISÃO	42

3.13 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO (EXATIDÃO).....	42
3.14 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	43
3.14.1 Influência do pH.....	43
3.14.2 Condicionamento para estabelecer qual a melhor concentração, volume de amostra, solvente de eluição e volume de reconstituição.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS OTIMIZAÇÃO NO AGILENT 1260 PARA DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS	45
4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO E DE EXTRAÇÃO	47
4.2.1 Linearidade	47
4.2.2 Limite de detecção e quantificação	49
4.2.3 Precisão	51
4.2.3.1 Repetibilidade ensaio (intra-dia).....	51
4.2.3.2 Ensaio inter dia.....	51
4.2.4 Exatidão	52
4.2.5 Robustez	53
4.3 INFLUÊNCIA DO pH NA OTIMIZAÇÃO DO SPE	53
4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3	54
4.5 OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO.....	57
4.6 MELHORES CONDIÇÕES DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO.....	58
4.7 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO BELÉM.....	59
4.8 AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE PADRÃO	59
4.9 DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE FLUOXETINA E HALOPERIDOL EM AMOSTRAS DE ÁGUAS COLETADAS NO RIO BELÉM	61
5. CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Os poluentes orgânicos persistentes são substâncias químicas naturais ou artificiais que podem permanecer no meio ambiente por muito tempo. Possuem propriedades que em sua maioria podem acumular-se nos organismos vivos, incluindo o homem. Essa bioacumulação e bioamplificação ocorrem através de propriedades físico-químicas de suas moléculas, fazendo com que não sejam degradadas resistindo aos diversos tipos de ambientes (GUI *et al.*, 2014; LE *et al.*, 2014).

O crescimento populacional e a consequente ampliação das atividades industriais e agropecuárias a fim de supri-lo promoveu nas últimas décadas um aumento exacerbado da poluição ambiental, especialmente dos recursos hídricos, uma vez que águas de rios e mares são os principais dispersores de resíduos associados essencialmente ao despejo de esgotos urbanos e industriais (HILTON *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2011)

A produção e utilização agrícola ou industrial de forma intensa destes compostos durante décadas levaram à contaminação generalizada do meio ambiente (BALLESTEROS *et al.*, 2014). Isso vem ocorrendo pela grande quantidade em que são produzidos e pela exigência de novos materiais que vem sendo desenvolvidos, muitas vezes sem o conhecimento se o mesmo possui características para tornarem-se poluidores orgânicos persistentes (FENSTAD *et al.*, 2014).

São incluídos como poluentes orgânicos persistentes diversas substâncias, como os produtos químicos industriais, retardadores de chama bromados, bifenilas policloradas, compostos perfluorados, subprodutos de processos industriais como o hexaclorobenzeno e dioxinas, pesticidas como o dicloro difenil tricloroetano e outros. Todos possuem diferentes graus de resistência à biodegradação (FENSTAD *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas houve um aumento considerável da preocupação com os poluentes orgânicos persistentes, pois estudos demonstram o seu grande poder tóxico, prejudicial para animais que estão sendo expostos a essas substâncias. Esses animais tem apresentado mudanças comportamentais e físicas, levando muitos deles à extinção, principalmente animais aquáticos (MWANAMOKI *et al.*, 2014).

Vários meios naturais transportam esses poluentes para as mais diversas áreas do mundo. O transporte atmosférico de longo alcance é uma das principais vias que transportam poluentes persistentes para lugares extremamente longe da origem das mesmas (GARRISON *et al.*, 2014). Contudo, o meio aquático é o principal responsável por levar esses contaminantes em maiores quantidades, para lugares até então isentos dessas substâncias (MWANAMOKI *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, agências ambientais regulatórias de alguns países desenvolvidos vêm buscando desenvolver procedimentos de controle de substâncias poluentes potencialmente tóxicas ao meio ambiente e também à saúde humana. Dessa forma, o monitoramento de poluentes orgânicos em baixíssimas concentrações, normalmente na faixa de mg.L^{-1} a ng.L^{-1} , vem ganhando cada vez mais importância (SILVA *et al.*, 2011).

A evolução científica vem fornecendo técnicas analíticas cada vez mais eficientes, embasadas essencialmente na pré-concentração e na cromatografia, de modo que a pesquisa ambiental tem voltado o olhar para os micropoluentes, permitindo sua determinação das mais diversas matrizes ambientais, como águas, efluentes, solos e emissões gasosas (MWANAMOKI *et al.*, 2014).

Contaminação de rios por esses poluentes vem sendo uma preocupação mundial, pois as águas residuais das cidades são lançadas em afluentes, e esta água residual possui diversos tipos de substâncias persistentes de utilização humana, como detergentes, produtos cosméticos, fármacos, metabólitos de fármacos e outros. Por mais que sejam encontrados em pequenas quantidades, vão apresentar toxicidade ao meio, sendo essas substâncias são chamadas de micropoluentes (BILA, DEZOTTI, 2003).

A inexistência de dados em relação à ocorrência de fármacos psicotrópicos nas águas superficiais na cidade de Curitiba-PR justifica a importância que esse trabalho tem de desenvolver um método analítico capaz de detectar dois poluentes emergentes.

1.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e quantificar na água do Rio Belém em Curitiba a presença de cloridrato de fluoxetina e haloperidol.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a extração, concentração e quantificação de Fluoxetina e Haloperidol na água do rio Belém em Curitiba-PR;
- Validar os parâmetros de linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), robustez, precisão e exatidão do método analítico para determinação da fluoxetina, e do haloperidol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Determinar as condições ideais para extração, identificação e quantificação de fluoxetina e haloperidol em amostras aquosas por extração em fase sólida (EFS);
- Contribuir com as ações dos serviços de saúde pública e meio ambiente por meio das informações obtidas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÁGUA E POLUIÇÃO

O crescimento das cidades vem aumentando muito, chegando a saturar a carga poluidora dos efluentes, o que tem mudado conceitos que predominam durante séculos de que a água sempre esteve à disposição do homem em quantidade infinita e que também se tratava de um recurso natural auto-sustentável (PHILIPPI, 2005).

Contudo, a maioria da água disponível no mundo não pode ser consumida e nem usada na agricultura, pois 97% dela encontra-se na água do mar. Três quartos da água doce está fora do alcance dos homens, pois estão localizados em geleiras e nas calotas polares (BAIRD, 2002).

Rios e lagos são os principais fornecedores de água para os homens, representando menos de 0,01% do suprimento total de água existente no planeta. Estima-se que aproximadamente 2,89 bilhões de m³/ano de esgotos sanitários são despejados diretamente nos corpos de água pelas redes coletoras de esgoto em áreas urbanizadas, sem tratamento (ANA, 2009; BAIRD, 2002).

Algumas estações de tratamento de água brasileiras não conseguem tratar toda água que exige sua demanda. Isso ocorre pelo grande consumo de água pela população e sua má distribuição, gerando escassez da mesma para muitos seres vivos (COSTA, 2007).

Devido à sua constante interação com o comportamento humano, ambientes aquáticos, ao longo do tempo, têm se tornado sistemas cada vez mais complexos, pois apresentam substâncias que jamais apareceriam naturalmente. Substâncias essas que podem estar dissolvidas, suspensas, adsorvidas e sedimentadas. Essas substâncias contaminam o meio ambiente aquático por diferentes fontes, como efluentes industriais e o escoamento superficial urbano e rural (GIORDANO, 1999).

Determinados ensaios químicos podem fornecer informações relevantes, como fontes e estágios de poluição e potencial do metabolismo biológico presente nos corpos hídricos (VOGT *et al.*, 1998). Diante disso, quando se estuda a qualidade dos corpos hídricos, faz-se necessário a realização de uma série de determinações analíticas.

A escassez e a poluição dos recursos hídricos têm diversas consequências sociais, econômicas e ambientais negativas, uma vez que: não contribuem com a diluição de poluentes, comprometendo o equilíbrio dos ecossistemas, dificultando a preservação da biodiversidade, provocando doenças devido à falta ou má qualidade da água, prejudicando as propostas paisagísticas, assim como as atividades de recreação e lazer, comprometendo o desenvolvimento industrial, da agricultura e da pesca (PHILIPPI, 2005).

2.2 FÁRMACOS

O termo fármaco define as substâncias responsáveis pela modulação fisiológica ou ação farmacológica, amplamente utilizados para curar ou diagnosticar, realizar o tratamento de sintomas e prevenção de doenças. Podem ser usados para diversas finalidades como: fornecer elementos que não estão em equilíbrio em organismos como as vitaminas e sais minerais; combater infecções, bloqueio temporário de uma ação fisiológica normal, corrigir funções desreguladas e desintoxicar os organismos (SUCHARA, 2007).

Os fármacos são desenvolvidos e utilizados por suas atividades biológicas específicas, e sua classificação é realizada de acordo com a sua finalidade, por exemplo: antibióticos, analgésicos, antineoplásicos, antialérgicos, anti-inflamatórios, contraste de raios X, dentre outros (KHETAN *et al.*, 2007; SUCHARA, 2007).

A maioria dos fármacos disponíveis atualmente são de origem sintética, representando uma grande parcela no mercado farmacêutico, com um valor monetário estimado em cerca de 390 bilhões de dólares no ano 2000. No ano de 1991, 866 fármacos eram utilizados em farmacoterapias, dos quais 79% já

eram de origem sintética, os outros correspondem a produtos semi-sintéticos ou de origem natural (MENEGATTI, 2001).

No século XIX a grande parcela dos fármacos era obtida de forma natural e não tinham natureza e nem estrutura química conhecida. No início do século XX foram introduzidas no mercado os primeiros barbitúricos, os derivados arsenicais e a insulina. Antes dos anos 40 foram descobertas a estreptomicina, clortetraciclina, cloranfenicol e a famosa penicilina. Mais foi após os anos 40 que ocorreu a introdução exacerbada de novos fármacos ao mercado, e por isso ocorreu cura de doenças infecciosas em casos que jamais pensariam que houvesse a possibilidade de acontecer (ROZENFELD, 1988).

2.3 FÁRMACOS COMO CONTAMINANTES AMBIENTAIS EMERGENTES

A poluição de corpos d'água por produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene pessoal é denominada poluição por poluentes emergentes. Há pouco tempo atrás pensava-se que a contaminação da água estava relacionada apenas com a contaminação microbiológica e por dejetos industriais (ONESIOS *et al.*, 2009).

Esses contaminantes novos estão ganhando bastante importância, pois além de estarem no meio ambiente por um longo tempo, sua presença está sendo elucidada agora. O grande interesse na determinação desses contaminantes ocorre pelo motivo de não possuírem legislações que os regulamentam na qualidade da água, estando assim abertos a serem classificados e regulamentados pela legislação, necessitando para isso de estudos sobre os reais potenciais toxicológicos ao meio ambiente e a saúde humana (SUCHARA, 2007).

Dentro da grande família de poluentes emergentes vale ressaltar a preocupação com o potencial poluente dos compostos farmacêuticos, uma vez que com o aumento populacional, com o avanço da medicina bem como o uso irracional devido à automedicação, o consumo de fármacos tem-se tornado cada vez maior (KOT-WASIK *et al.*, 2007).

Na maioria dos países desenvolvidos, ocorre o aumento da produção de fármacos, e também seu uso de forma deliberada pela população. Em certos casos essa utilização é tão alta que ultrapassa em quantidade o uso de outros compostos orgânicos usados de forma excessiva, como os pesticidas (KOT-WASIK *et al.*, 2007).

Poluições das águas por fármacos já são reconhecidas atualmente e já se tornaram uma preocupação ambiental mundial, pois fármacos são moléculas complexas, e o consumo das mesmas é exorbitante. Na União Européia cerca de 3.000 substâncias diferentes são usadas como ingredientes farmacêuticos, estando entre esses os antidepressivos, reguladores de lipídeos, anticoncepcionais, analgésicos, antibióticos, hipoglicemiantes e outros. Esses fármacos estão classificados em vários grupos terapêuticos com diversas propriedades físico-químicas, ação ambiental, estruturas químicas, e particularidades como persistência em ambiente aquático (RICHARDSON, 2007; SUCHARA, 2007).

Necessariamente o volume de produção de um determinado fármaco não é preocupante, mas caso sua persistência no ambiente aquático seja detectada, sua importância se eleva e muito para ser determinado sua toxicidade e alto potencial para apresentar efeitos em certas funções biológicas, como a reprodução dos seres aquáticos. O Quadro 1 apresenta os fármacos emergentes que causam maiores contaminações e preocupações para o meio ambiente (KHETAN *et al.*, 2007; PAVLOVIC *et al.*, 2007).

QUADRO 1. Fármacos emergentes mais comuns como contaminantes

CLASSES TERAPÊUTICAS	FÁRMACOS
β-lactâmicos	Amoxicilina, benzilpenicilina
Macrolídeos	Eritromicina, azitromicina
Sulfonamidas	Sulfametazina, sulfadiazina
Tetraciclina	Tetraciclina
Antiinflamatórios não esteroidais	Ibuprofeno, diclofenaco
Antidepressivo	Fluoxetina
Hormônios	Estriol, dietilestilbestrol

Fonte: O autor (2016), adaptado de KHETAN *et al*, 2007; PAVLOVIC *et al.*, 2007

A grande preocupação é de que estes compostos, que foram concebidos para terem efeitos biológicos específicos, atinjam organismos não-alvo, bem como cheguem ao consumo humano, uma vez que, de modo geral, os processos de tratamento de esgoto e de água para o consumo não apresentam como foco a remoção desses poluentes. A exposição contínua pode desencadear efeitos toxicológicos adversos à saúde humana e aos organismos aquáticos, como desregulação endócrina e do sistema reprodutivo humano e animal, distúrbios metabólicos, além da indução de bactérias mais resistentes (TESSARO *et al.*, 2013).

2.4 FÁRMACOS PSICOTRÓPICOS

Essencialmente existem quatro categorias principais de substâncias psicotrópicas: os ansiolíticos, como os benzodiazepínicos, usados e tratamentos para ansiedade (diazepam); os antidepressivos como a fluoxetina; os estabilizantes de humor, e os antipsicóticos ou neurolépticos, muito usado em casos de doenças psiquiátricas graves, como o haloperidol (FORTE, 2007).

Devido à automedicação e a prescrição excessiva pelos médicos, em especial dos ansiolíticos e dos antidepressivos, o consumo de fármacos de uso psiquiátrico tem se descontrolado e vem se tornando um problema de saúde pública (LARANJEIRA, 2012).

A fluoxetina é um dos medicamentos antidepressivos mais prescritos no Brasil e no mundo, devido especialmente a evidências de atuação na redução de peso. O Paraná foi classificado como o quarto maior estado consumidor *per capita* de produtos industrializados à base de cloridrato de fluoxetina em 2009, segundo estudo divulgado pelo Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados – SNGPC. Em 2011, Curitiba também assumiu a quarta posição no consumo de fluoxetina dentre as capitais brasileiras, ficando atrás apenas de Vitória, Belo Horizonte e Goiânia (ANVISA, 2009).

O consumo crescente apresenta risco ao meio ambiente devido ao descarte inadequado e à falta de regulamentação ambiental que implica no escasso monitoramento desses compostos em esgotos e matrizes ambientais. Como consequência, a presença de fármacos de diversas classes em recurso hídrico, até mesmo em águas para o consumo humano, vem sendo relatada em diversos países (GAFFNEYA *et al.*, 2014).

Recentemente houve um crescimento significativo em pesquisas na Europa e na América do Norte a fim de definir os riscos potenciais associados à exposição a produtos farmacêuticos presentes em recursos hídricos, essencialmente em água doce (GAW *et al.*, 2014).

Somente na Europa já foram detectadas mais de 300 compostos farmacêuticos e seus metabolitos em diversas matrizes ambientais. Outros 52 países detectaram a presença de fármacos no meio ambiente, sendo as águas residuais urbanas a principal fonte de dispersão desses poluentes. Fármacos como a carbamazepina, o naproxeno e o sulfametoxazol já foram detectados em águas superficiais e para o consumo em mais de 29 países (GAW *et al.*, 2014).

A exposição contínua a baixas concentrações de medicamentos psicoativos como antidepressivos e antipsicóticos ainda é alvo de investigação

científica, contudo estudos revelam que esses compostos afetam os organismos aquáticos, implicando, muitas vezes, em efeitos semelhantes aos do neurotransmissor serotonina, que regula grande variedade de sistemas fisiológicos como a vasoconstrição em peixes e a reprodução de moluscos. Além disso, existe a preocupação com a possível bioacumulação, uma vez que os medicamentos são formulados para serem persistentes até que sua função seja desempenhada. A exposição crônica pode levar a alterações no comportamento humano dentre outros efeitos adversos (LAJEUNESSE *et al.*, 2008; GAFFNEYA *et al.*, 2014; FENT *et al.*, 2006) .

Tais antecedentes refletem a necessidade de se monitorar a presença de fármacos psicotrópicos no meio ambiente, o que implica na necessidade de se estabelecer metodologias para quantificação de baixas concentrações destes compostos em matrizes ambientais de relevância.

2.5 OCORRÊNCIA DE RESÍDUOS DE FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE

Após a pessoa ou um animal consumir um medicamento, o fármaco que estava diluído junto com outros adjuvantes farmacêuticos é absorvido, distribuído, biotransformado, e por fim excretado tanto na forma original quanto na forma de metabólitos. Muitas dessas substâncias são persistentes, e por inúmeras rotas, chegam às estações de tratamento de esgoto (TAMBOSI, 2010; KOT-WASIK *et al.*, 2007; DAUGHTON *et al.*, 1999).

Nas estações de tratamento de esgoto não há degradação desses fármacos persistentes, e consequentemente os mesmos são lançados nos corpos d'água, resultando na contaminação de lagos, rios, lençóis subterrâneos e estuários. Nesse processo de tratamento de esgoto é formado o lodo que é lançado em campos agrícolas, quando não tratado e estabilizado, causa contaminação no solo, nas águas superficiais e percolação para água subterrânea (DAUGHTON *et al.*, 1999).

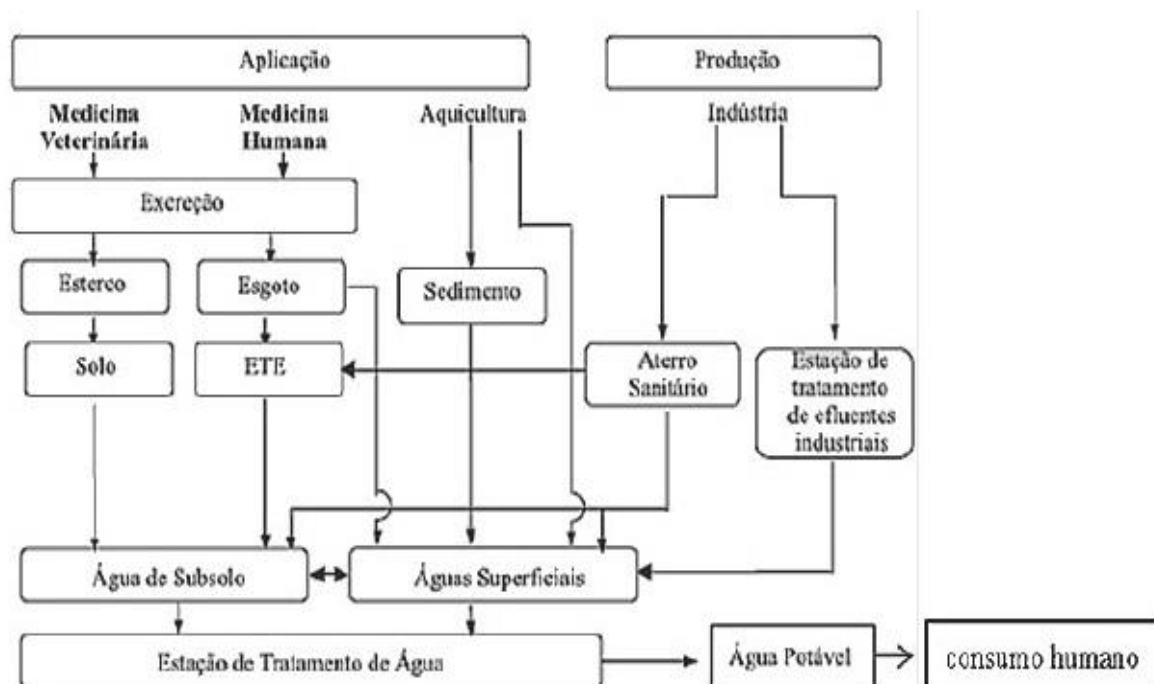


FIGURA 1. Possíveis rotas de contaminação por fármacos no meio ambiente (BILA *et al.*, 2003)

Existem vários estudos em diferentes países (Japão, Espanha, Inglaterra, Escócia, Polônia e outros) do mundo sobre a detecção de fármacos em diversas matrizes, sendo as mesmas muito complexas como efluentes, afluentes de estação de tratamento de esgoto e água de superfície. Na tabela 1 alguns desses trabalhos estão expostos de forma resumida.

No Brasil esses estudos ainda são escassos. No estado do Rio de Janeiro, foi desenvolvido um método para encontrar resíduos de anti-inflamatórios, reguladores de lipídeos e seus metabólitos em efluentes de estação de tratamento de esgoto. Nessa amostra conseguiram detectar concentrações de 0,1 a 1 PPB, e em águas de rios encontraram concentrações entre 0,02 a 0,04PPB (STUMPF *et al.*, 1997).

TABELA 1. Trabalhos publicados na literatura envolvendo a detecção e quantificação de resíduos de fármacos no meio ambiente.

Fármaco	Concentração em $\mu\text{g L}^{-1}$	Amostra	País	Referência
Sulfonamidas	0,00005-0,0539	Água de superfície de rio	Espanha	GARCIA-GALÁN, 2010
Cafeína, Atenolol, Metoprolol, Oxazepan, Carbamazepina, Cetoprofeno, Naproxeno, Ibuprofeno e Diclofenaco	0,007-1,16	Água do mar	Suécia	MAGNÊR, 2010
Naproxeno, Ibuprofeno, Diclofenaco e Genfibrozila	0,001-0,121	Água do mar	Cingapura	WU, 2010
Paracetamol, Dipirona, Acido Salicílico, Carvedilol, Cetoprofeno, Prednisolona, Dexametasona, Carvedilol, Cloridrato de Propranolol e Tartarato de Metoprolol.	Somente acido salicílico foi detectado e quantificado: 9,55	Água de rio	Polônia	BARANOXSICA, 2009
Atenolol, Cloridrato de Fluoxetina, Sulfametoxazol, Diclofenaco, Levonorgestrel	0,0008-0,019	Água de torneira	França	VULLIET, 2009
Testosterona e Trilosina (uso veterinário)	0,0002-0,071	Água de efluente e afluente.	França	VULLIET, 2009
Domperidona, Prepiconazole, Itraconazol, Rabeprazol, Miconazol, Cetoconazol, Miconazol, Cinarizina e Flubendazol	0,612-0,143	Água de efluente e afluente	Bélgica	STEENES, 2008
Bezafibrato, Cafeína, Carbamazepina, Clotrimazol, Diclofenaco e Furosemida.	9,172-2,478	Água de efluente e afluente	Irlanda	LCEY, 2008.

FONTE: O autor (2016).

Ternes *et al* (1997) determinaram em Penha-RJ estrogênios e contraceptivos em estações de tratamento de esgotos, nas concentrações de 0,021 e 0,040 PPB respectivamente.

Foi desenvolvido no estado de Santa Catarina por Suchara *et al*, em 2008, um método para verificar a presença de vários fármacos em efluente de esgoto. Infelizmente o método não apresentou sensibilidade suficiente para detectar nenhum dos fármacos procurados.

Em outro estudo realizado em amostras de água potável na cidade de Campinas-SP, o composto bisfenol foi encontrado na concentração de 0,16PPB, e cafeína na concentração de 0,22 PPB (SODRÉ *et al.*, 2010)

Sodré *et al* (2010) determinaram métodos para a detecção em amostras de águas superficiais de amoxicilina, ampicilina, cefalexina, ciprofloxacino, norfloxacino, sulfametoxazol, tetraciclina e trimetoprim. Os mesmos foram encontrados em baixíssimas concentrações.

2.6 FLUOXETINA COMO POLUENTE

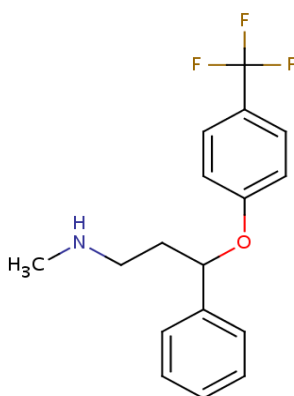


FIGURA 2. Molécula da Fluoxetina

FONTE: BANKDRUG (2015)

- Nome químico N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil) fenoxi] propan-1- Amina
- Classe: antidepressivo
- Fórmula Molecular: C₁₇H₁₈F₃NO
- MassaMolar: 309,33g/mol
- Log Kow: 3,82
- PKa: 8,7

A fluoxetina é um fármaco psicotrópico potente, utilizado há mais de 25 anos. Seu mecanismo de ação é como um inibidor direto e seletivo da

recaptação da serotonina, bloqueando a membrana plasmática do transportador do mesmo, assim deixando o neurotransmissor livre na fenda sináptica. (KIER SCH *et al.*, 2010).

Inibidores da recaptação de serotonina são atualmente os medicamentos antidepressivos mais prescritos em todo mundo, sendo a fluoxetina um destes medicamentos mais comumente utilizados (KIER SCH *et al.*, 2010) (SUMPTER *et al.*, 2014). Por esta razão, a fluoxetina rapidamente se tornou um dos medicamentos mais importantes no campo da medicina, apresentando um crescente número de distúrbios por ela tratados, variando de depressão, obsessões até a ansiedade, por isso o seu consumo anual vem aumentando (KIER SCH *et al.*, 2010).

Atualmente, outras grandes áreas vêm estudando a fluoxetina, pois sua crescente utilização em todo o mundo vem trazendo outras consequências, e uma preocupação crescente para a biologia, química ambiental e toxicologia aquática. O seu uso difundido em diversos países é responsável pela sua presença no ambiente aquático, sendo encontrado principalmente em rios próximos a grandes cidades (FRANZELLITTI *et al.*, 2014, HAZEILTON *et al.*, 2014, POI *et al.*, 2014).

Estações de tratamento de esgoto são apontadas como as principais vias de contaminação de fluoxetina em sistemas de água doce. Como uma grande parte deste medicamento é ingerido e consequentemente excretado pelo corpo humano ou descartado de maneira incorreta, de forma indireta chega em sistemas de tratamento de esgoto. Estes compostos não são completamente eliminados nas estações de tratamento de águas residuais sendo expulsos com o efluente em rios (DZIEWECZYNSKI *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por Gardner *et al* (2012) constatou que em rios do Reino Unido que estavam altamente impactados pelas águas de esgoto, e que apresentavam pouca vazão, apresentaram concentrações de dezenas de ng.L^{-1} , estando dessa forma muitos organismos aquáticos expostos de forma crônica a este fármaco,

podendo estar sofrendo algum tipo de toxicidade. Existem muitos relatos sobre a toxicidade da fluoxetina em baixas concentrações em peixes.

Joel Weinberger II realizou vários ensaios com peixes, e concluiu que a fluoxetina apresentou grandes impactos comportamentais, principalmente em sua reprodução. Também verificou que sua toxicidade é dose dependente, e atinge de forma intensa os machos, mas se os peixes forem retirados da exposição à fluoxetina, os mesmos voltam a ter comportamentos normais ao grupo controle (WEINBERGER *et al.*, 2014)

2.7 HALOPERIDOL

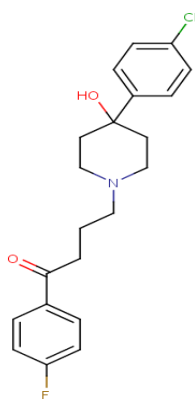


FIGURA 3. Molécula do Haloperidol.

FONTE: BANKDRUG (2015)

- Nome químico: a IUPAC 4-(4-(4-clorofenil)-4-hidroxipiperidin-1-il)-1-(4-fluorofenil)butan-1-ona
- Classe: Antipsicótico
- Fórmula Molecular: $C_{21}H_{23}ClFNO_2$
- Massa Molar: 375,85g/mol
- Log Kow: 4,3
- PKa: 8,66

Perto da década de 50 ocorreu um marco na farmacoterapia psiquiátrica, pois foram implantados para o tratamento da esquizofrenia os medicamentos antipsicóticos clássicos, alcançando resultados jamais esperados para o

prognóstico de diversas patologias do sistema nervoso central. O principal representante deste grupo de fármacos foi a clorpromazina. Após certo tempo outros antipsicóticos clássicos foram sintetizados, como as butirofenonas, classe na qual o haloperidol se encontra (BENNET *et al.*, 1996).

As butirofenonas tiveram seu perfil farmacológico desvendado totalmente ao acaso, pois na tentativa de aumentar a atividade analgésica da meperidina, sintetizaram análogos nor-meperidinicos, assim chegaram aos análogos propiofenonicos, que tem 200 vezes mais o poder de analgesia que a meperidina. E em paralelo outro composto foi sintetizado, o haloperidol que apresentou ações farmacológicas parecidas com a clorpromazina (BENNET *et al.*, 1996).

O haloperidol tem propriedades neurolépticas e antipsicóticas sendo muito utilizado na farmacoterapia da esquizofrenia e também em estados psicóticos parecidos. O haloperidol apresenta efeitos adversos ao ser humano como a maioria dos fármacos existentes, mas seus efeitos são gravíssimos, pois o paciente pode apresentar hipotensão e anormalidades na função motora (BENNET *et al.*, 1996).

2.8 DETERMINAÇÃO DE MICROPOLUENTES POR ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica de separação extremamente versátil, permitindo análises qualitativas e quantitativas de uma vasta gama de substâncias em um curto intervalo de tempo (NOGUEIRA *et al.*, 2011)

De modo automatizado e apresentando elevada resolução, eficiência e principalmente sensibilidade. Esta técnica é vastamente empregada na indústria e em laboratórios de análise e pesquisa, e suas características vem fazendo com que seja uma importante ferramenta para análises ambientais (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

A baixa concentração dos analitos de interesse bem como a complexidade das matrizes ambientais fazem com que o uso de técnicas de pré-concentração seguida de análise cromatográfica, especialmente associada a detecção de massas, seja cada vez mais frequente no monitoramento de micropoluentes. Apesar de ser muito eficaz para análises simultâneas de muitos contaminantes, a detecção por massas apresenta elevado custo de equipamento e manutenção, de modo que a detecção de compostos orgânicos por ultravioleta se apresenta como uma alternativa menos dispendiosa e com sensibilidade satisfatória, permitindo análises ambientais com o propósito de triagem com limites de detecção na faixa de concentração de $\mu\text{g L}^{-1}$ (SILVA, COLLINS, 2011).

Diversos estudos relatam métodos para determinação simultânea de fármacos polares via cromatografia líquida de fase reversa. Essencialmente colunas C18 vêm sendo utilizada no monitoramento com diversos métodos de detecção. As fases móveis mais utilizadas são metanol:água ou acetonitrila:água, com ajuste da força cromatográfica até obtenção da separação adequada das bandas de eluição. A adição de modificadores e tampões permite o ajuste do pH do meio favorecendo a ionização dos analitos, buscando uma melhor interação com a fase móvel e a fase estacionária (SILVA, COLLINS, 2011).

Na tabela 2 encontram-se informações sobre 2 trabalhos que determinaram características dos fármacos de interesse

TABELA 2. Dados cromatográficos da literatura para a determinação de fluoxetina e haloperidol.

	Haloperidol	Fluoxetina
Referências	ALI <i>et al.</i> , 2005	SILVA <i>et al.</i> , 2008
Matrizes	Preparações Farmacêuticas	Plasma humano
Fase estacionária	Fase reversa	Fase reversa
Dimensão da partícula	5 µm	5 µm
Dimensões da coluna	250 mm x 4,6 mm	250 mm x 4,0 mm
pH	3,0	3,8
Volume de injeção	20 µL	50 µL
Fluxo	1mL min ⁻¹	1mL min ⁻¹
Temperatura	30 °C	25 °C
Detector	DAD a 230 nm	DAD a 230nm
Método de separação	Isocrático	Isocrático

FONTE: O autor (2016)

2.9 RIO BELÉM

A Bacia Hidrográfica do rio Belém é uma bacia curitibana, constituindo-se como manancial superficial para diversos usos. O Rio Belém nasce e deságua no município de Curitiba (Paraná, Brasil). Sua nascente localiza-se no bairro Cachoeira, e sua foz – junto ao rio Iguaçu – no bairro Boqueirão (ANDREOLI, 2000; IAP, 2005).

É o principal rio da bacia hidrográfica do Rio Belém, uma das 39 sub-bacias hidrográficas do Alto Iguaçu e uma das 6 bacias hidrográficas que banham Curitiba. Possui aproximadamente 17,13 km de extensão e tem como

afluentes os rios: Água Verde, Fanny, Ivo e Parolin (ANDREOLI, 2000; IAP, 2005).

A bacia do Rio Belém abrange aproximadamente 87,80 km² de área drenada. Banha uma área intensamente urbanizada, um dos principais motivos pelos quais o Rio Belém foi “quase que totalmente canalizado para dar espaço a construções” (IAP, 2009), e para minimizar problemas com enchentes em algumas áreas urbanas, como no caso de uma das principais ruas de Curitiba, a Mariano Torres (ANDREOLI, 2000; IAP, 2005).

Sua área de drenagem representa cerca de 20% da área do Município de Curitiba e abriga aproximadamente 50% de sua população. Engloba os principais bairros da cidade, entre eles o centro e os principais pontos notáveis naturais e arquitetônicos que tem representado a Cidade de Curitiba, conferindo-lhe uma grande importância simbólica, consideradas as dimensões geográfica, social, econômica e cultural (IAP, 2005). Entretanto, o estado de conservação das suas águas não está à altura da sua importância simbólica, estando poluídas e contaminadas, primordialmente, por esgotos domésticos e resíduos sólidos. Estima-se que cerca de 90% da poluição das águas do rio Belém é originária de esgotos domésticos, e 10% se origina a partir de efluentes industriais (SUDERHSA, 1998; IAP, 2005).

A figura 4 expõe o mapa hidrográfico do rio Belém, e também mostra alguns pontos em relação a sua poluição.



FIGURA 4. Localização da sub-bacia hidrográfica do rio Belém.

NOTA: Roxo: poluído, Laranja: muito poluído, Vermelho: extremamente poluído

2.10 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS)

A extração em fase sólida é uma opção comumente utilizada para conseguir retirar analitos de matrizes aquosas complexas. Com essa técnica é possível extrair e pré-concentrar o analito em estudo (KOSTOPOULOU *et al.*, 2008; SUCHARA, 2008; METCALFE *et al.*, 2003; WEIGEL *et al.*, 2004; LIU, ZHOU, WILDING 2004; JOSS *et al.*, 2005; PETROVIĆ *et al.*, 2005).

Esse tipo de extração apresenta elevado custo, pois é preciso solventes específicos e mais ainda a aquisição dos cartuchos que irão extrair os analitos de interesse. Porém, com ela é possível conseguir excelentes fatores de pré-concentração, uma vantagem primordial para se trabalhar com micropoluentes em águas de rios (BARRIONUEVO, LANÇAS, 2001)

A extração em fase sólida é dividida em etapas (CALDAS *et al.*, 2011):

- Condicionamento do cartucho, onde o objetivo desta etapa é eluir impurezas que possam estar junto ao cartucho e também ativar o seu sorvente;

- Percolação da amostra, onde a amostra adquirida é passada por dentro do cartucho, para então reter o analito;
- Lavagem do cartucho, onde visa retirar interferentes da amostra;
- Eluição dos analitos, é nessa etapa que os analitos serão retirados do cartucho em um solvente devidamente estudado e testado.

A EFS é facilmente automatizada, permitindo extrair dezenas de amostras simultaneamente, o que não ocorre com a extração líquido – líquido. A extração em fase sólida além de apresentar melhores recuperações, o tempo gasto de extração é menor, requer menor consumo de reagentes e permite uma maior seletividade que a extração líquido-líquido (HENNION, 1999)

2.11 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma série de avaliações, denominadas validação. Com ênfase em diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou não exatidão dos resultados obtidos (RIBANI *et al.*, 2004).

Segundo Ribani e colaboradores (2004), a validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e procede no decorrer de todo o seu desenvolvimento e transferência, sendo que um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado.

Vários trabalhos na literatura descrevem os parâmetros que devem ser, avaliados na validação de métodos e, geralmente há uma concordância que estes parâmetros analíticos devem incluir: curva analítica, linearidade, exatidão, precisão, limites de detecção e de quantificação (DAÍ *et al.*, 2015; BIRCH *et al.*, 2015; FERNANDEZ *et al.*, 2010; THOMAS *et al.*, 2014).

2.11.1 Curva analítica e linearidade

A curva analítica corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área da banda cromatográfica) e a concentração do analito. É necessário elaborar uma curva de calibração para cada analito que se deseja determinar e para cada corrida analítica. Esta relação matemática geralmente é chamada curva analítica (CASSIANO *et al.*, 2009).

As diretrizes da ANVISA especificam um mínimo de cinco níveis de concentração, juntamente com certos mínimos de variação especificados por esse mesmo órgão.

A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear (Equação 1) (LANÇAS, 2004).

Equação 1: $y = ax + b$

Onde:

y = resposta medida (altura ou área do pico).

x = concentração.

a = inclinação da curva analítica = sensibilidade (Coeficiente angular)

b = interseção com o eixo y (Coeficiente linear)

A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados em função da concentração do analito ou então calculados a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (r) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada a reta como modelo matemático. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI *et al.*, 2004).

2.11.2 Limite de quantificação e limite de detecção

Os termos limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito. O LD é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído. O LQ refere-se à menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão (RIBANI *et al.*, 2004; CASSIANO *et al.*, 2009).

Os dois, LD e LQ, podem ser estimados através do método visual, ou pelo método relação sinal/ruído e também pelo parâmetros da curva analítica. A razão sinal/ruído com valor entre 3 e 10 é geralmente considerada aceitável para estimar o limite de detecção e quantificação, respectivamente. O método por parâmetros da curva analítica é muito utilizado para técnicas analíticas em geral (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2004).

2.11.3 Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. É importante observar que um valor exato ou verdadeiro é o valor obtido por uma medição perfeita e este valor é indeterminado por natureza (RIBANI *et al.*, 2004).

Os guias do FDA e da ANVISA preconizam que a precisão e a exatidão, devem ser investigadas pela análise de, no mínimo, 3 controles de qualidades (CQ) analisados em 5 replicatas de preparo de amostras, com níveis de concentrações, baixa (CQB), média (CQM) e alta (CQA) em relação ao intervalo de concentração da curva de calibração (CASSIANO *et al.*, 2009).

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$. Pelo fato de que outros componentes da

matriz podem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados durante a avaliação da exatidão do método (RIBANI *et al.*, 2004; SANCO, 2009).

2.11.4 Precisão

A precisão de um método analítico é a medida dos erros aleatórios, e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostragens múltiplas de uma amostra homogênea. Este é um importante parâmetro que possibilita decidir se o método analítico é confiável ou não para o objetivo da análise. A precisão é expressa pelo desvio padrão relativo, sendo aceitáveis valores menores ou iguais a 20% para análise de resíduos. A precisão deve ser avaliada: através da repetibilidade (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dias) (CASSIANO *et al.*, 2009; RIBANI *et al.*, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO

Empregou-se como local de estudo, três pontos do rio Belém, rio que corta a cidade de Curitiba. Estes locais são pontos onde os rios encontram-se menos ou mais poluídos, ou seja, locais onde pode haver lançamento direto de esgoto doméstico nos rios. Na tabela 3 encontram-se as coordenadas desses pontos.

TABELA 3. Coordenadas dos 3 pontos de coleta.

Pontos de Coleta		
1	2	3
S 25° 21.158	S 25° 23.258	S 25° 30.473
WO 49° 16.210	WO 49° 16.007	WO 49° 12.925
Próximo a rua Rolando Salim Zappa Mansur, número 489	Próximo a Rua João Gava, em frente ao parque São Lourenço	Próximo a Rua Bey Zorning

FONTE: O autor (2016)

Ponto de coleta 1

Lugar próximo a nascente do rio Belém, pouco impactado pela poluição, contudo é possível a visualização de lançamento de esgoto não tratado de forma direta. Não apresenta odor ruim.



FIGURA 5. Foto do primeiro ponto de coleta próximo a nascente do Rio Belém.

NOTA: Foto elaborada pelo autor (2016).

Ponto de coleta 2

Apresenta sinais de poluição, é possível a visualização de lançamento de esgoto não tratado de forma direta, e também de objetos como latas, sacolas plásticas e garrafas pet. Não apresenta odor ruim.



FIGURA 6. Foto do segundo ponto de coleta
NOTA: Foto elaborada pelo autor (2016).

Ponto de coleta3

Lugar totalmente poluído, grande quantidade de lançamento de esgoto não tratado, grande quantidade de objetos lançados. Apresenta forte odor ruim.



FIGURA 7. Foto do terceiro ponto de coleta

NOTA: Foto elaborada pelo autor (2016).

3.2 AMOSTRAGEM

Com o objetivo de determinar a fluoxetina e haloperidol, foram realizadas 3 coletas dos 3 pontos nos meses de Maio, Junho e Julho de 2015.

Todas as vidrarias utilizadas neste trabalho foram lavadas com água corrente, e após foram mergulhadas em solução de ácido nítrico 10% por no mínimo 12 horas. Após esse período foram lavadas novamente com água corrente, álcool, água corrente, água destilada e água ultrapura (Millipore-Simplicity UV, MA, USA).

As amostras foram coletadas em frasco âmbar de 1L, mantidas em ambiente controlado, e armazenadas a 4°C.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Em todos os frascos âmbar foram adicionados 1mL de metanol para inibir a atividade microbiana das amostras. Águas de superfícies de rios são muito complexas, com inúmeras substâncias dissolvidas e suspensas, que

podem interferir na determinação dos fármacos escolhidos. Os analitos de estudo normalmente são encontrados em concentrações mínimas, o que torna indispensável antes da análise por CLAE, a extração e pré concentração.

As amostras, após serem coletadas, foram filtradas a vácuo em microfiltro de fibra de vidro 0,45 μm , reduzindo a quantidade de material particulado presente nas amostras. Após essa fase, a amostra foi dividida em dois balões volumétricos de 500 mL, e a um deles foi adicionado padrão, e no outro seguiu-se sem adição de padrão. O filtrado foi submetido à EFS. Para a concentração das amostras, foi utilizado um sistema *manifold* Waters (WAT200608) operado com bomba de vácuo (Tecnal TE-0581). Os cartuchos usados foram os Strata-X® (Phenomenex) 500mg de 3mL.

A secagem dos cartuchos e dos extratos das amostras foi realizada com fluxo gentil de nitrogênio comercial (White Martins) sob aquecimento a 40 °C.

3.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

O desenvolvimento experimental consistiu na validação de um método para determinar resíduos de fármacos em águas superficiais empregando a EFS para extração e pré-concentração das amostras, e CLAE para determinação dos compostos.

O estudo foi desenvolvido no laboratório de Pós Graduação do departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.5 FÁRMACOS ESCOLHIDOS

A seleção do haloperidol foi baseada em um trabalho atual e no Projeto de pesquisa do Pet-Saúde (2015-2016) – Redes de Atenção Psicossocial- Ministério da Saúde em conjunto com a UFPR e Secretaria Municipal de Saúde de. O Haloperidol decanoato 50mg mL⁻¹ injetável foi o mais utilizado e o Haloperidol 5mg mL⁻¹ injetável foi o quarto mais utilizado (FEDERHEN *et al.*, 2014).

A ANVISA em 2009 realizou um levantamento da utilização da fluoxetina em todo Brasil, o Paraná estava entre os 10 estados que mais consumiram esse fármaco. Neste levantamento calculou-se que cada habitante paranaense consome aproximadamente 27,5 mg por ano.

Devido ao alto consumo de haloperidol pelo CAPs e da fluoxetina pela população em geral no Paraná, procedeu-se a escolha desses fármacos para o presente trabalho.

3.6 PADRÕES E REAGENTES

Os padrões utilizados foram cloridrato de fluoxetina (USP, LOT: 518), padrão farmacêutico com grau de pureza de 99,9%, e haloperidol (FARMACOPEIA BRASILEIRA, LOT: 1058) com grau de pureza 99,6%.

Os solventes utilizados foram acetonitrila e metanol grau HPLC (99,99%, JTBaker) e água ultra pura (Millipore-Simplicity UV, MA, USA). Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4 , 99,0%) da marca J.T.Baker juntamente com o ácido ortofosfórico (85%) (J.T.Baker) foram utilizados para a elaboração da solução tampão utilizada nas análises cromatográficas.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se viradria analítica previamente calibrada e limpa.

3.7 PREPARO DE SOLUÇÕES

Foram preparadas soluções estoque de cada um dos analitos, fluoxetina e haloperidol, ambas com concentração de 100 mg L^{-1} em metanol, pesando-se 0,0001mg dos padrões em balança analítica Sartorius CP225D, e diluindo-os em 10mL de metanol. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e sobre refrigeração a -4°C . Através destas soluções estoque, foram preparadas soluções de trabalho diluindo-as em água em concentrações entre 10 e $1500 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para preparo da solução tampão fosfato foram pesados 1,36 g de fosfato de potássio monobásico em balança semi-analítica OHAUS Adventure ProAV264P e dissolvidos em 1000mL de água ultrapura. O pH foi ajustado para 3,5 com ácido ortofosfórico 85%, e monitorado com auxílio de pHmetro Micronal B474.

3.8 VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO E DE EXTRAÇÃO DO HALOPERIDOL E FLUOXETINA

Para obter provas da eficiência do método de determinação de haloperidol e fluoxetina foi realizada a validação do mesmo, através do qual os resultados foram avaliados de acordo com referências pré-estabelecidas em guias para o procedimento de validação de métodos analíticos e de organizações como ANVISA, INMETRO, IUPAC, EURACHEM, além de estar de acordo com trabalhos que abordam a validação de métodos analíticos (BERG *et al.*, 1988; BRITO *et al.*, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; PINHO *et al.*, 2009).

A legislação, quando se refere à validação de metodologias, apresenta várias interpretações possíveis, e isso permite a adaptação para cada tipo de problema que apresentam os diversos tipos de matrizes aquosas (RIBANI *et al.*, 2004). Os parâmetros a serem avaliados na validação dependem da natureza da metodologia e da finalidade do uso do método analítico, por isso nem sempre é necessário levar todos os critérios em consideração. Deve-se verificar e utilizar os critérios de maior importância para conseguir o melhor processo de validação (VAN ZONEN, 1999; RIBANI *et al.*, 2004). Desta forma avaliou-se a linearidade, a precisão, o limite de detecção e o limite de quantificação, e a exatidão (relacionada à extração em fase sólida).

3.9 LINEARIDADE

Para determinação da linearidade, primeiramente foram construídas curvas analíticas pelo método de padronização externa, que compara a área da

substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas, a partir de soluções com concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

As soluções de trabalho foram preparadas a partir de uma solução estoque de 100 mg L⁻¹ de cada um dos fármacos. As curvas analíticas foram realizadas em CLAE-FR assistida por DAD e fluorescência a partir da diluição das soluções estoque nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 50, 70, 90, 110, 150, 200, 500, 1000 e 1500 µg L⁻¹ para Fluoxetina (fluorescência a 290nm) e haloperidol (DAD 254nm).

Foram empregados no mínimo 9 valores de concentração, o que está bem acima do especificado pela IUPAC (THOMPSON *et al.*, 2002) e pela ANVISA (2003), que especificam um mínimo de seis e cinco níveis de concentração, respectivamente, para análise da linearidade.

A partir dos valores obtidos por meio da curva analítica calculou-se o coeficiente de correlação (r), tendo como critério mínimo aceitável de $r = 0,99$ (ANVISA, 2003).

3.10 LIMITE DE DETECÇÃO DO MÉTODO (LD)

O LD foi determinado em parâmetros da curva analítica, e através da análise de cromatogramas obtidos para concentrações decrescentes dos fármacos.

A estimativa do LD foi realizada com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, e determinado pela equação:

$$LD = 3 \times s / S$$

Onde “s” é o desvio padrão do intercepto (coeficiente linear) com o eixo do Y de 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação, e “S” é o coeficiente angular da curva de calibração (BRASIL, 2003).

3.11 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO (LQ)

O LQ foi estimado pelo método baseado em parâmetros da curva analítica e por análises de soluções decrescentes dos analitos até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis.

A estimativa do LQ foi realizada com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base, e determinado pela equação:

$$LD = 10 \times s / S$$

Onde “s” é o desvio padrão do intercepto (coeficiente linear) com o eixo do Y de, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação, e “S” é o coeficiente angular da curva de calibração (BRASIL, 2003).

3.12 PRECISÃO

A precisão foi avaliada mediante a determinação da repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão intercorrídas). Para determinação da repetibilidade, realizou-se a injeção da mesma amostra em triplicata dos padrões dos fármacos em 3 níveis de concentração: 1000 µg L⁻¹, 500 µg L⁻¹ e 50µg L⁻¹ no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada através da injeção de amostras dos padrões dos fármacos nos mesmos níveis de concentração empregados na repetibilidade e em triplicata em 3 dias diferentes: 1º dia, 7º dia e 14º dia. Para a análise deste parâmetro foram realizadas novas soluções de trabalho com os padrões dos fármacos nas duas concentrações testadas, para cada dia analisado.

3.13 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO (EXATIDÃO)

Neste trabalho, a exatidão está relacionada com a porcentagem de recuperação proporcionada pela técnica de Extração em Fase Sólida (EFS) em água ultrapura.

3.14 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

3.14.1 Influência do pH

Um dos parâmetros críticos a serem observados durante a determinação de fármacos, é o que se refere ao pH da amostra, que deve ser otimizado em função da acidez ou basicidade dos analitos, pois em muitos casos, o pH do meio determina a forma química do composto em solução, e consequentemente interfere na eficiência da extração (HERNÁNDEZ *et al.*, 2007; SILVA, COLLINS, 2011).

Foram avaliados diferentes valores de pH, (4, 6.5 e 8) na recuperação dos analitos em cartuchos StrataX (500 mg, 3 mL) em triplicata.

TABELA 4. Condições empregadas na avaliação da influência do pH na extração em fase sólida.

Concentração de fluoxetina e haloperidol em $\mu\text{g L}^{-1}$	Volume das amostras (mL)	Volume de reconstituente em mL
10	200	1

FONTE: O autor (2016)

3.14.2 Condicionamento para estabelecer qual a melhor concentração, volume de amostra, solvente de eluição e volume de reconstituição

A avaliação da concentração, volume de amostra e solvente de eluição foi realizada via planejamento fatorial 2^3 com triplicata do ponto central utilizando cartuchos StrataX (500 mg, 3 mL), pH otimizado previamente igual a 4,00. As condições avaliadas estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^3 testados para a recuperação de fluoxetina e haloperidol em água acidificada pH 4,00, empregando cartuchos Strata X.

Fatores	-	0	+
S eluição	ACN	ACN:Metanol	Metanol
V amostra	100 mL	200 mL	300 mL
Concentração	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	20 $\mu\text{g L}^{-1}$	30 $\mu\text{g L}^{-1}$

FONTE: O autor (2016)

As amostras reconstituídas foram analisadas nos respectivos métodos cromatográficos descritos anteriormente. Após a otimização do pH, concentração, volume de amostra e solvente de eluição, foi avaliado univariadamente em duplicata o volume de reconstituição, que variou entre: 0,25 mL, 0,5 mL e 1,0 mL.

As amostras reconstituídas foram analisadas nos respectivos métodos cromatográficos, já descritos anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS OTIMIZAÇÃO NO AGILENT 1260 PARA DETERMINAÇÃO DOS ANALITOS

Para a otimização da separação cromatográfica dos compostos, foi preparada uma mistura da solução padrão dos analitos. Injetou-se a solução contendo a mistura dos compostos na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, a fim de observar o tempo de retenção de cada analito. Os melhores resultados para obtenção da separação para os analitos estão apresentados na tabela 6.

TABELA 6. Melhores resultados para obtenção da separação dos analitos.

	HALOPERIDOL	FLUOXETINA
Coluna	Waters XBridge 100mmx 2,1 mm, tamanho de partícula 5 μm	
Fase móvel	acetonitrila:tampão fosfato 0,01M pH 3,50 (25:75, v:v)	
Detector e comprimento de onda	254 nm	Fluorescência (emissão:230nm, absorção:290nm)
Fluxo da fase móvel	0,4 mL min ⁻¹	
Temperatura de forno	30°C	
Volume de injeção	15 μL	

FONTE: O autor (2016)

Nas condições estabelecidas, no método desenvolvido, o haloperidol e a fluoxetina apresentaram tempo de retenção de 6,9 e 24,9 minutos respectivamente.

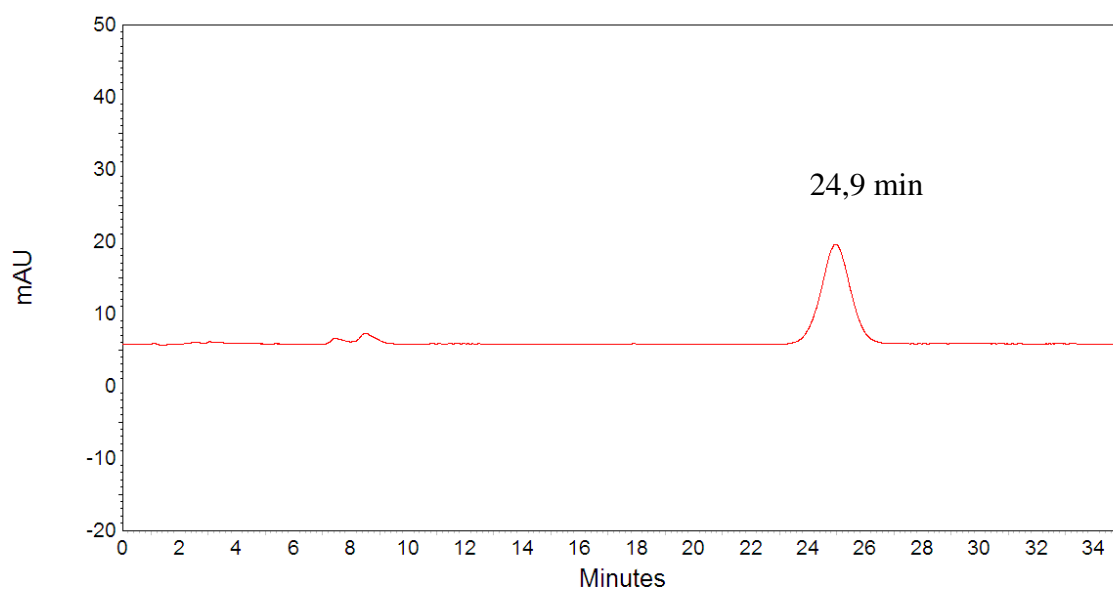


FIGURA 8. Cromatograma apresentando o tempo de retenção da fluoxetina.
FONTE: O autor (2016)

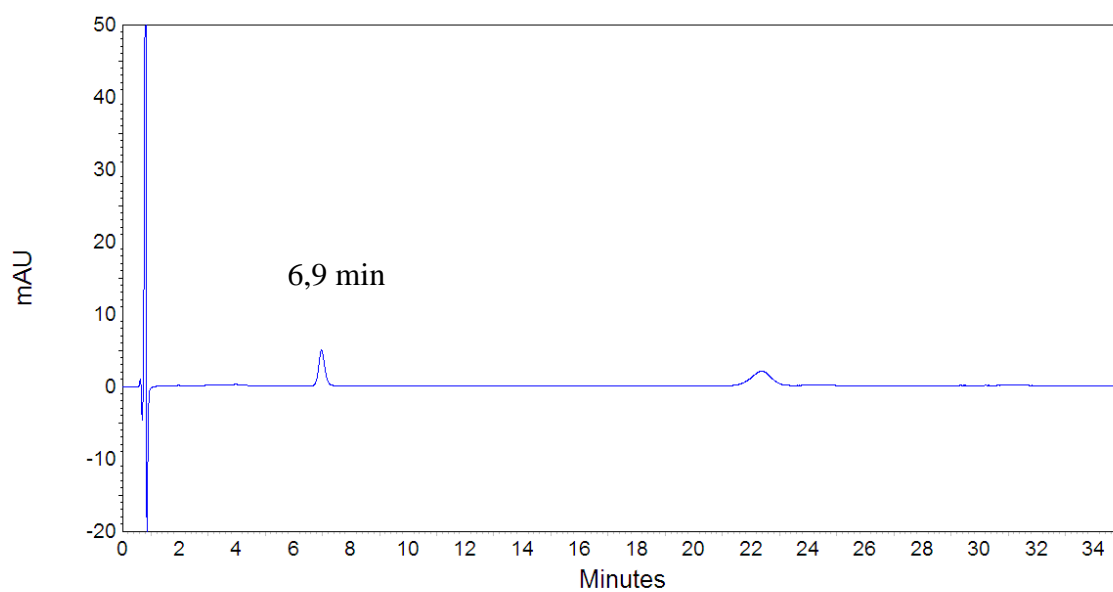


FIGURA 9. Cromatograma apresentando o tempo de retenção do haloperidol.
FONTE: O autor (2016)

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO E DE EXTRAÇÃO

4.2.1 Linearidade

A faixa de trabalho empregada na validação dos parâmetros analíticos foi determinada baseando-se nos valores de concentração encontrados na literatura para o haloperidol e fluoxetina, e na capacidade de detecção do equipamento para os fármacos analisados.

As curvas analíticas foram realizadas em CLAE-FR a partir da diluição das soluções estoque nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 50, 70, 90, 110, 150, 200, 500, 1000 e 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Fluoxetina (fluorescência a: excitação em 230 e emissão em 290nm) e haloperidol (DAD 254nm) (Figura 10 e 12).

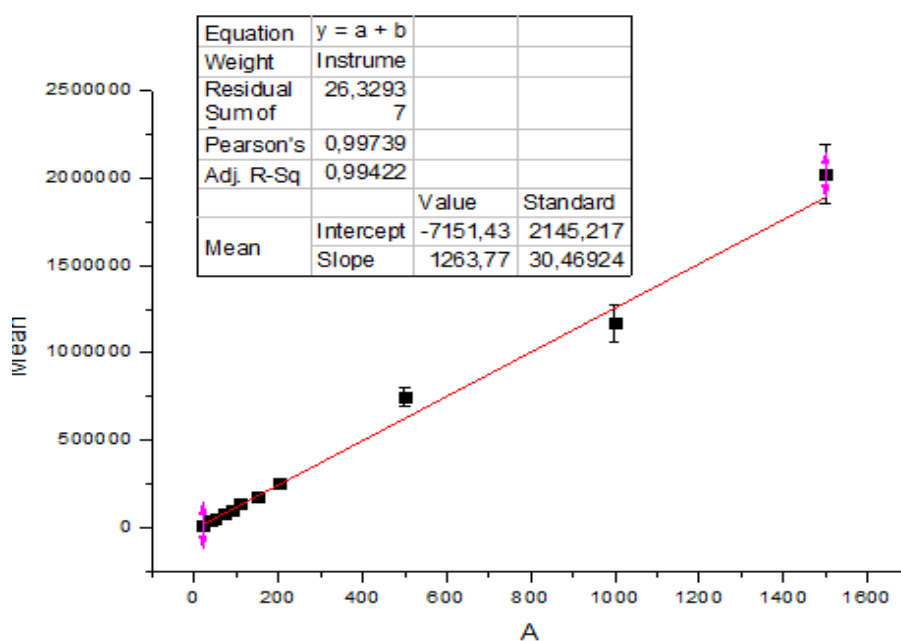


FIGURA 10. Curva analítica da Fluoxetina.

FONTE: O autor (2016)

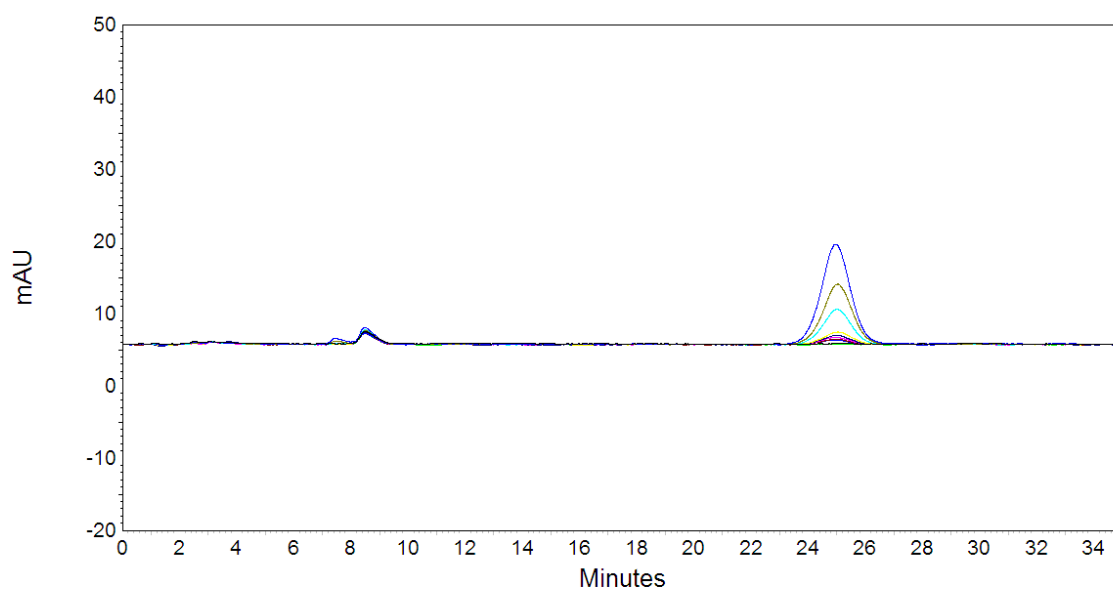


FIGURA 11. Cromatogramas sobrepostos das diferentes concentrações do padrão de fluoxetina.

FONTE: O autor (2016)

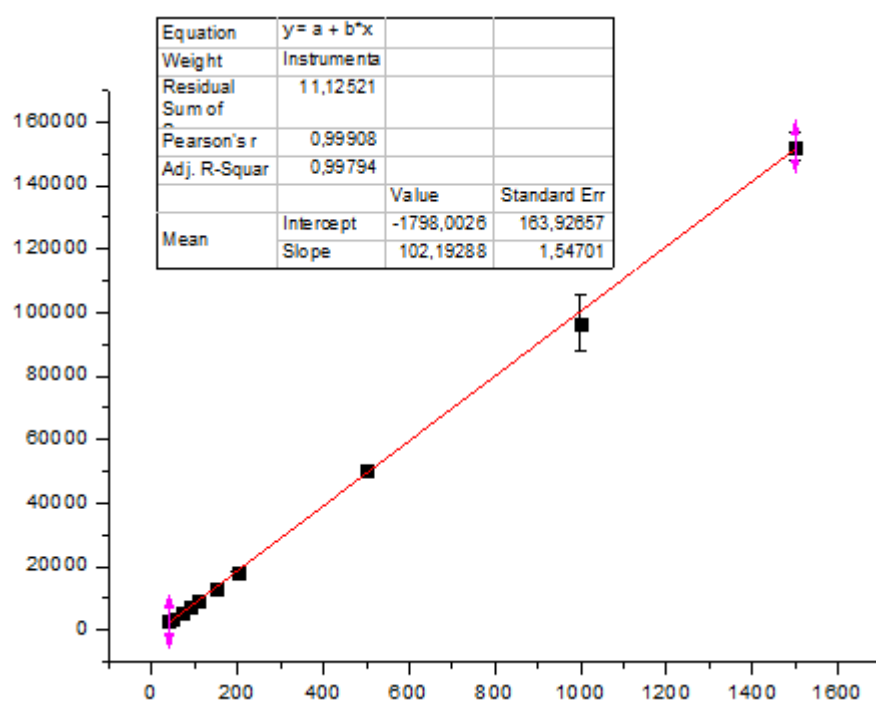


FIGURA 12. Curva analítica do haloperidol.

FONTE: O autor (2016)

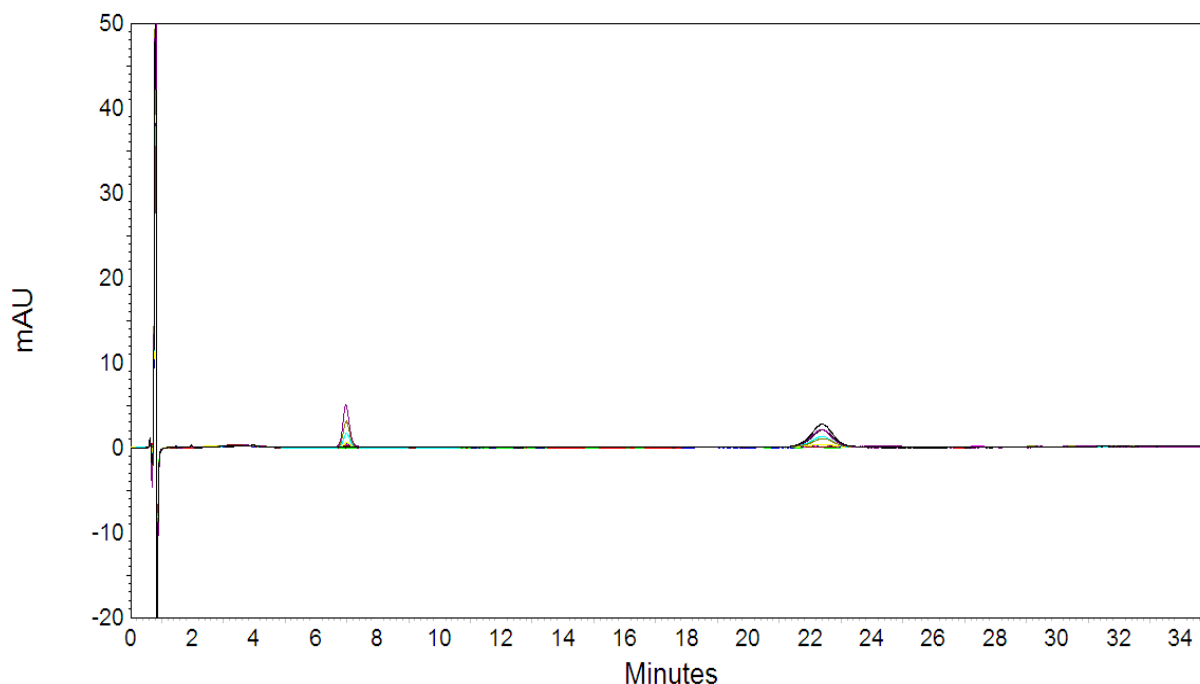


FIGURA 13. Cromatogramas sobrepostos das diferentes concentrações do padrão de fluoxetina.

FONTE: O autor (2016)

As curvas analíticas construídas apresentaram coeficiente de correlação acima de 0,99, o que corresponde ao valor mínimo recomendado pela ANVISA (2003). Este valor é considerado adequado, pois o coeficiente de correlação demonstra que a resposta do detector apresenta-se linear nos valores de concentração empregados neste estudo.

4.2.2 Limite de detecção e quantificação

Os Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados de acordo com as recomendações do INMETRO, que considera o LD como a menor concentração que pode ser detectada, e o LQ como a menor concentração que pode ser quantificada, ambas com valores aceitáveis de precisão e exatidão, o qual normalmente permite variações máximas de 20% (INMETRO, 2007).

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003) os limites de detecção e quantificação podem ser calculados com base em parâmetros da curva analítica, sendo a razão entre a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a inclinação da curva de regressão multiplicada por 3 no caso de LD e por 10 quando LQ.

Os limites de detecção e quantificação estão expostos na tabela 8.

TABELA 7. LD e LQ calculados a partir das curvas analíticas.

Fármaco	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Haloperidol	14,025	42,50
Fluoxetina	26,68	80,83

FONTE: O autor (2016)

Como as amostras anteriormente passariam pela etapa de EFS, o seu fator de pré concentração deve-se ser reajustada para o método, assim apresentando LD e LQ 100x mais sensível.

Na tabela 8 estão expostos os resultados encontrados de LD e LQ para cada fármaco com o fator de concentração já calculados.

TABELA 8. Limites de detecção e quantificação encontrados para o método proposto.

Fármaco	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Haloperidol	0,14	0,425
Fluoxetina	0,27	0,81

FONTE: O autor (2016)

Esses valores obtidos estão próximos, porém apresentam-se menos sensível do que os valores apresentados por outros trabalhos publicados (KHETAN *et al.*, 2007; PAVLOVIC *et al.*, 2007).

4.2.3 Precisão

4.2.3.1 REPETIBILIDADE ENSAIO (intra-dia)

No ensaio da precisão, normalmente a ANVISA (2003) não permite valores superiores a 5% para a determinação de fármacos em medicamentos. Porém, para amostras complexas, como águas de superfícies somente aceita-se um CV de até 15%. Já o INMETRO (2003) permite um CV de 20% na análise deste parâmetro.

Realizou-se análises com 3 concentrações diferentes: $50\mu\text{g L}^{-1}$, $500\mu\text{g L}^{-1}$ e $1000\mu\text{g L}^{-1}$, todas em triplicata.

Os coeficientes de variação obtidos nesse ensaio estão expostos na tabela 9.

TABELA 9. Coeficiente de variação referente às injeções de triplicatas de padrões de 50, 500 e $1000\mu\text{g L}^{-1}$ no mesmo dia.

Compostos	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	CV(%)
Haloperidol	50	7,52
	500	0,87
	1000	5,68
Fluoxetina	50	3,88
	500	4,91
	1000	6,11

FONTE: O autor (2016)

O ensaio de repetibilidade no mesmo dia mostrou coeficientes de variação (CVs) entre 0,87% e 7,52%, sendo o menor valor de CV para a solução padrão de haloperidol $500\mu\text{g L}^{-1}$, e o maior valor de CV para o padrão de Haloperidol no nível de concentração mais baixo ($50\mu\text{g L}^{-1}$).

4.2.3.2 Ensaio inter-dia

Realizou-se análises com 3 concentrações diferentes: $50\mu\text{g L}^{-1}$, $500\mu\text{g L}^{-1}$ e $1000\mu\text{g L}^{-1}$, todas em triplicata, em 3 dias diferentes.

Os coeficientes de variação obtidos nesse ensaio estão expostos na tabela 10.

TABELA 10. CVs referente às injeções de triplicatas de padrões de 50, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ em três dias diferentes.

Compostos	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	CV(%)
Haloperidol	50	8,35
	500	6,37
	1000	7,12
Fluoxetina	50	4,58
	500	7,61
	1000	5,87

FONTE: O autor (2016)

O ensaio de repetibilidade em dias diferentes mostrou coeficientes de variação (CVs) entre 4,58% e 8,35%, sendo o menor valor de CV para a solução padrão de fluoxetina 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, e o maior valor de CV para o padrão de Haloperidol no nível de concentração mais baixo (50 $\mu\text{g L}^{-1}$).

4.2.3 Exatidão

Nesse trabalho, a exatidão foi calculada através do ensaio de recuperação dos analitos em EFS. Foi utilizado volume de 100 mL de amostras de água que foram previamente fortificadas em apenas 1 nível de concentração. Foi descartada a hipótese de realizar a recuperação em outras concentrações, pois em águas superficiais é estimado que caso ocorra a presença desses fármacos, o mesmo apresenta-se em concentrações ínfimas. As amostras fortificadas foram posteriormente avaliadas no método cromatográfico citado. As análises foram realizadas em triplicata.

TABELA 11. Recuperações obtidas e o coeficiente de variação referente às injeções de triplicatas de padrões de 100 µg L⁻¹.

Concentração mg L ⁻¹	Fluoxetina	CV	Haloperidol	CV
100	87,2%	9,3%	73,7%	8,1%

FONTE: O autor (2016)

4.2.4 Robustez

O ensaio de robustez mostrou que o método é capaz de suportar variações na temperatura, sem que ocorram mudanças significativas na recuperação dos analitos e na eficiência cromatográfica.

Os valores dos CVs das áreas encontrados para fluoxetina e haloperidol, na concentração de trabalho, estão dentro da variação do próprio método (Tabela 12).

TABELA 12. Áreas médias obtidas e o CV referente às injeções de triplicatas dos padrões.

Modificação		Média das áreas			
		Haloperidol	CV (%)	Fluoxetina	CV (%)
TEMPERATURA (°C)	25	48953	1,4	615289	0,80
	30	50164	0,87	629568	5,42
	35	50982	0,73	627514	1,93

FONTE: O autor (2016)

4.3 INFLUÊNCIA DO pH NA OTIMIZAÇÃO DO EFS

Na tabela 13 estão apresentados os resultados obtidos a partir do teste com diferentes pH.

TABELA 13. Recuperação dos cartuchos StrataX (500 mg, 3 mL) em diferentes valores de pH.

pH	4	6,5	8
Fluoxetina	35,83%	Nd	nd
Haloperidol	41,17%	Nd	Nd

FONTE: O autor (2016)

Não ocorreu recuperação da fluoxetina e do haloperidol em pH 6,5 e 8, e por isso foi utilizado o pH de 4.00.

4.4 PLANEJAMENTO FATORIAL²³

Resultados obtidos para o planejamento fatorial 2^3 avaliando os efeitos do solvente de eluição ($S_{\text{eluição}}$), do volume da amostra (V_{amostra}) e da concentração (C) na recuperação da fluoxetina e haloperidol.

TABELA 14: Efeitos do solvente de eluição ($S_{\text{eluição}}$), do volume da amostra (V_{amostra}) e da concentração (C) na recuperação da fluoxetina (FX) e haloperidol (HL).

Ensaio	Variáveis				
	$S_{\text{eluição}}$	V_{amostra}	C	FX	HL
1	-	-	-	102,57	78,43
2	+	-	-	24,86	31,81
3	-	+	-	76,67	78,12
4	+	+	-	54,63	68,22
5	-	-	+	88,28	78,36
6	+	-	+	111,59	127,09
7	-	+	+	90,99	82,89
8	+	+	+	78,04	67,83
PC	0	0	0	80,30	95,64
PC	0	0	0	87,60	97,43
PC	0	0	0	78,70	93,13
Média do PC				82,20	95,40
Estimativa do desvio padrão (s) do PC				4,74	2,16

FONTE: O autor (2016)

A fim de avaliar qual ensaio apresenta as melhores condições para pré-concentração de todos os analitos, e a influência dos fatores estudados na resposta, o cálculo dos efeitos do planejamento foi realizado, e os resultados obtidos estão expostos na Tabela 15.

TABELA 15. Efeitos principais e de interação entre os fatores otimizados pelo planejamento fatorial 2^3 , fluoxetina (FX) e haloperidol (HL).

Fármaco	txs	Efeitos						
		S _{elução}	V _{amostra}	C	SxV	SxC	VxC	SxVxC
FX	20,4	-22,35	-6,74	27,54	4,85	27,53	-8,68	-22,98
HL	9,29	-5,71	-4,66	24,90	-6,76	22,55	-22,71	-25,13

FONTE: O autor (2016)

Com base nas estimativas do desvio padrão para cada analito (obtido via triplicata do ponto central), com 95% de confiança ($t_{(v=2, 95\% \text{confiança})} = 4,303$), a maioria dos efeitos se mostraram significativos, com exceção do efeito do solvente de eluição para o HL, cujo efeito calculado (-5,71) foi inferior à estimativa do desvio (9,29), o volume de amostra, o qual o efeito foi calculado (-4,66) junto com o efeito de interação entre solvente de eluição e o volume de amostra (SxV= -6,76) também foram inferiores a estimativa do desvio.

Para a fluoxetina foram calculados os efeitos principais e de interação entre os fatores otimizados, tendo como referência a estimativa do desvio padrão obtido através da triplicata do ponto central, com 95% de confiança ($t_{(v=2, 95\% \text{confiança})} = 4,303$). Os valores dos efeitos de volume de amostra (-6,74), efeito de interação entre solvente de eluição e volume de amostra (SxV= 4,85) e efeito de interação entre volume de amostra e concentração (VxC= -8,68) foram inferiores a estimativa do desvio.

Como os efeitos de terceira ordem (SxVxC) obtidos revelaram-se significativos (maior que 20,4 para fluoxetina e 9,29 para o haloperidol) na pré-

concentração da fluoxetina e do haloperidol, esses fatores citados não podem ser avaliados individualmente, e para uma melhor visualização, as Figuras 14 e 15 apresentam a interpretação geométrica para cada fármaco.

haloperidol

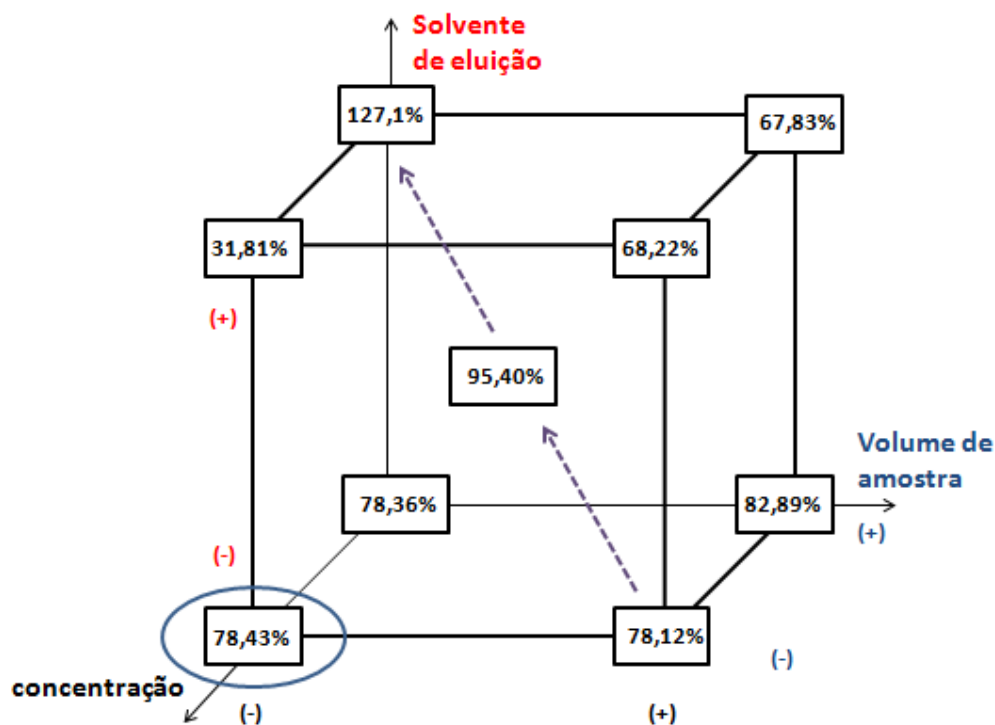


FIGURA 14. Interpretação geométrica dos efeitos significativos do planejamento 2^3 para os resultados obtidos das recuperações do haloperidol.

FONTE: O autor (2016)

fluoxetina

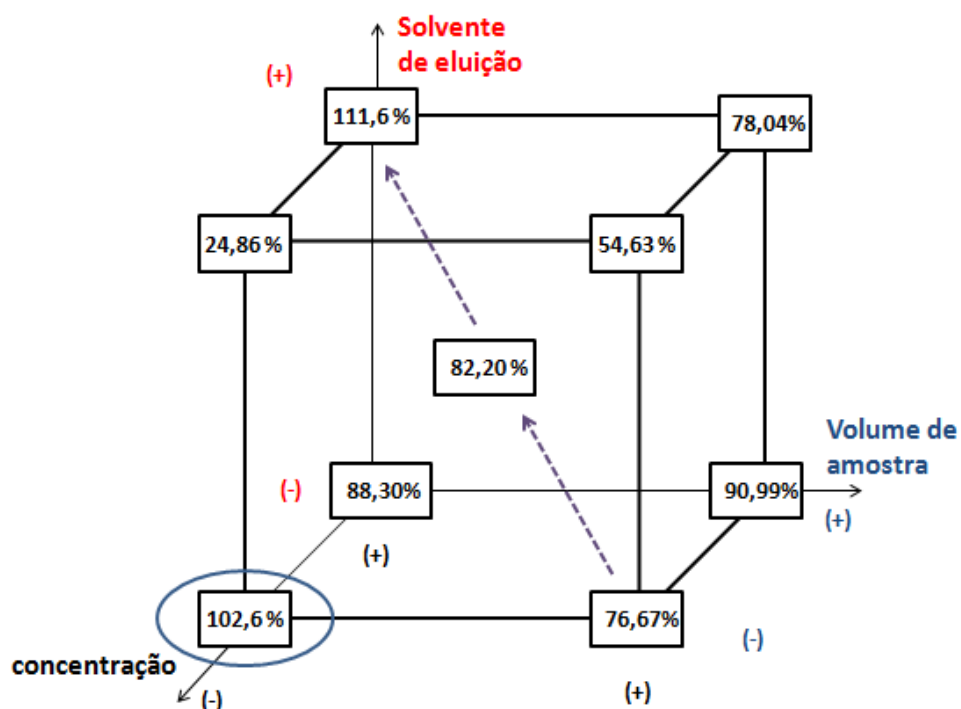


FIGURA 15. Interpretação geométrica dos efeitos significativos do planejamento 2^3 para os resultados obtidos das recuperações da fluoxetina.

FONTE: O autor (2016)

Tanto para a fluoxetina, quanto para o haloperidol, a melhor condição de extração foi com acetonitrila como solvente de eluição, 100mL de volume de amostra e 300 ng.L^{-1} , porém a concentração de amostra escolhida foi de 100 ng.L^{-1} , pois esse trabalho foi realizado em cooperação com outra mestranda, a qual apresentou resultados melhores para a concentração escolhida.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO

Como os melhores valores encontrados pelo planejamento fatorial 2^3 para volume de amostra foram de 100mL, este ensaio foi realizado com a intenção de aumentar o valor da pré concentração do método. Caso os valores obtidos fossem confiáveis e com alta recuperação dos analitos, no mínimo seria dobrado o valor da pré concentração, e assim o método ficaria mais sensível.

Na otimização do volume de reconstituição, foram avaliados univariadamente os volumes de 1,00 mL, 0,500 mL e 0,250 mL de água ultrapura. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 16.

TABELA 16. Recuperações encontradas na otimização do volume de reconstituição.

Volume de reconstituição	Fluoxetina	Haloperidol
1,00 mL	87,2%	73,7%
0,5 mL	36,0%	22,0%
0,250 mL	63,3%	18,0%

FONTE: O autor (2016)

Os valores encontrados para recuperações com volume de reconstituição de 0,5 mL e 0,250 mL não foram melhores que 1 mL, assim não conseguimos aumentar o fator de pré concentração para 200x ou 400x.

Para a fluoxetina, o melhor volume de reconstituição seria 0,250 mL, pois mesmo perdendo em porcentagem para 1 mL, seu fator de pré concentração de 400x superaria a eficiencia da recuperação do valor encontrado em 1 mL, deixando o metodo mais sensível, porém o percentual de recuperação encontrado para o haloperidol em 0,250 mL foi de 18%, o que impossibilitou utilizarmos esse volume.

Foram encontrados valores de reconstituição ótimos para 1 mL, e por isso este volume foi escolhido para ser usado nas amostras do rio Belém.

4.6 MELHORES CONDIÇÕES DE PRÉ-CONCENTRAÇÃO

As melhores condições de pré concentração foram obtidas pelo condicionamento com 5,00 mL de acetonitrila e 5,00 mL de água pH 4,00, 100 mL de amostra em pH 4.00, eluição com 5,00 mL de acetonitrila e reconstituição com 1,00 mL de água. A taxa de recuperação da fluoxetina e do haloperidol foram de 87,2% e 73,7%, respectivamente.

4.7 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO BELÉM

Após a realização da otimização do método por CLAE, e posteriormente a pré-concentração, empregou-se as melhores condições adquiridas nas amostras de água do rio Belém. Foram analisadas as amostras puras (sem adição de padrão) e também as mesmas amostras foram separadas, e adicionados os padrões de cloridrato de fluoxetina e haloperidol analisadas. As amostras de águas foram coletadas nos 3 pontos já citados.

4.8 AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE PADRÃO

O método cromatográfico mostrou-se capaz de determinar ambos os fármacos em amostras com pouco interferentes, porém a complexidade das amostras escolhidas para esse trabalho, junto com o efeito da matriz, dificultam a determinação dos analitos de interesse, principalmente pelas substâncias que não são eliminadas no processo de filtragem, e de pré-concentração da amostra.

Foram adicionados os padrões nas amostras, e na primeira coleta obtivemos amostra com concentração de $3,10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cloridrato de fluoxetina e $2,36 \mu\text{g L}^{-1}$ de haloperidol.

Na tabela 17 estão as recuperações das análises realizadas em triplicata da primeira coleta com adição de padrão.

TABELA 17. Recuperação dos fármacos em amostra contendo adição de padrão da primeira coleta nos 3 pontos do rio Belém.

PONTOS DE COLETA	Recuperação da FLUOXETINA	C.V. (%)	Recuperação do HALOPERIDOL	C.V. (%)
1	39,9%	15,5	58,8%	7,8
2	31,7%	19,2	66,5%	19,8
3	38,5%	13	nd	Nd

C.V.= Coeficiente de variação

Nd = Não detectado

FONTE: O autor (2016)

Para a segunda coleta (Tabela 18), obtivemos as mesmas concentrações da primeira coleta, que foram de $3,10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cloridrato de fluoxetina, e $2,36 \mu\text{g L}^{-1}$ de haloperidol.

TABELA 18. Recuperação dos fármacos em amostra contendo adição de padrão da segunda coleta nos 3 pontos do rio Belém

PONTOS DE COLETA	Recuperação da FLUOXETINA	C.V. (%)	Recuperação do HALOPERIDOL	C.V. (%)
1	85,0%	5,32	62,5%	8,10
2	96,75%	14,72	55,50%	8,6
3	38,25%	17,4	Nd	Nd

C.V.= Coeficiente de variação

Nd = Não detectado

FONTE: O autor (2016)

Na tabela 19 estão expostos as recuperações da terceira coleta de amostras de água fortificadas com $3,50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cloridrato de fluoxetina e $3,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de haloperidol.

TABELA 19. Recuperação dos fármacos em amostra contendo adição de padrão da terceira coleta nos 3 pontos do rio Belém

PONTOS DE COLETA	Recuperação da FLUOXETINA	C.V. (%)	Recuperação do HALOPERIDOL	C.V. (%)
1	44,96%	22,29	66,84%	4
2	42,43%	27,57	49,32%	9,98
3	82,93%	7,84	85,98%	4,52

C.V.= Coeficiente de variação

Nd = Não detectado

FONTE: O autor (2016)

4.9 DETERMINAÇÃO DE CLORIDRATO DE FLUOXETINA E HALOPERIDOL EM AMOSTRAS DE ÁGUAS COLETADAS NO RIO BELÉM

Após a determinação do método cromatográfico e fatores de pré-concentração, este foi utilizado na determinação de cloridrato de fluoxetina e haloperidol em águas superficiais do rio Belém. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Na tabela 20 estão apresentados os resultados obtidos na primeira coleta.

TABELA 20. Resultados obtidos na primeira coleta do rio Belém.

PONTOS DE COLETA	FLUOXETINA em $\mu\text{g L}^{-1}$	C.V.(%)	HALOPERIDOL em $\mu\text{g L}^{-1}$	C.V. (%)
1	Nd		Nd	
2	Nd		Nd	
3	Nd		Nd	

C.V.= Coeficiente de variação

Nd = Não detectado

FONTE: O autor (2016)

Não foram encontrados valores de nenhum dos analitos procurados nos pontos de coleta. Na tabela 21 estão os resultados obtidos na segunda coleta, e a tabela 22 apresenta os resultados obtidos na terceira coleta.

TABELA 21. Resultados obtidos na segunda coleta do rio Belém.

PONTOS DE COLETA	FLUOXETINA em $\mu\text{g L}^{-1}$	C.V. (%)	HALOPERIDOL em $\mu\text{g L}^{-1}$	C.V. (%)
1	Nd		Nd	
2	Nd		Nd	
3	Nd		Nd	

C.V.= Coeficiente de variação

Nd = Não detectado

FONTE: O autor (2016)

TABELA 22. Resultados obtidos na terceira coleta do rio Belém.

PONTOS DE COLETA	FLUOXETINA em $\mu\text{g L}^{-1}$	C.V. (%)	HALOPERIDOL em $\mu\text{g L}^{-1}$	C.V. (%)
1	Nd		Nd	
2	Nd		Nd	
3	Nd		Nd	

C.V.= Coeficiente de variação

Nd = Não detectado

FONTE: O autor (2016)

A presença de contaminantes emergentes pode ser empregada como um marcador químico na avaliação de corpos hídricos, no entanto, a não-deteção do haloperidol e da fluoxetina nas amostras não descarta o lançamento irregular de esgotos, visto que estes compostos podem estar altamente diluídos ou apresentar elevada instabilidade sob as condições do ambiente aquático em questão.

A cafeína está sendo citada como exemplo de contaminante emergente, porque é um analito que sempre apresenta concentrações maiores que a fluoxetina e outros fármacos. Magnêr (2010) na Suécia a encontrou na água do mar na concentração de $1,16 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto a fluoxetina é encontrada normalmente com valores pelo menos 10 vezes menores que este (VULLIET, 2009).

A não detecção da fluoxetina e do haloperidol pode ter ocorrido pelo baixo LD e LQ do método desenvolvido, visto que não utilizou-se 300mL de amostra (melhor valor encontrado pelo planejamento fatorial), o que diminuiria em 3x os valores de LD e LQ encontrados para ambos os fármacos, pois ao invés de reduzir 100mL em 1mL, seria reduzido 300mL em 1mL, assim atingindo valores de LD de $8,89 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ de $26,94 \mu\text{g L}^{-1}$ para fluoxetina, e LD de $4,68 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ de $14,17 \mu\text{g L}^{-1}$. valores estes compatíveis com a literatura (MAGNÊR, 2010; GAFFNEYA *et al.*, 2014).

5. CONCLUSÕES

A EFS provou ser uma excelente técnica para o preparo das amostras aquosas. É rápida, pois permite o preparo simultâneo de até 20 amostras e possibilita extração e pré concentração dos fármacos ao mesmo tempo, tem baixo consumo de solvente e, conseqüentemente, gera poucos resíduos. O planejamento fatorial nos permitiu condicionar volume de amostra, solvente de eluição e concentração da amostra com eficiência e racionalizando o uso de cartuchos Strata X, gerando menos custos, e ainda nessa etapa houve uma pré concentração dos analitos em 100 vezes.

O método por CLAE-DAD/FLUORESCÊNCIA demonstrou ser uma técnica satisfatória, permitindo a realização de uma análise qualitativa e quantitativa dos analitos estudados, em um tempo de análise de 35 minutos.

Os resultados obtidos na validação do método foram satisfatórios. Os dois fármacos em estudo apresentaram excelente linearidade tanto instrumental quanto do método como um todo, com coeficientes de correlação (r) maiores que 0,99. Os limites de detecção foram baixos, de $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,27 \mu\text{g L}^{-1}$ para o haloperidol e fluoxetina, respectivamente. Limites de quantificação de $0,425 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,81 \mu\text{g L}^{-1}$ para o haloperidol e fluoxetina, respectivamente. As recuperações empregando EFS com cartuchos Strata-X, para os dois compostos estiveram entre 70 a 120%, apresentando boa precisão ($\text{RSD} \leq 20\%$) para os dois analitos.

Não foram detectados os fármacos nas amostras de água do rio Belém, porém pela quantidade de fluoxetina utilizada pela população, é certa que a mesma se encontra no rio, mas em concentrações inferiores ao LD do método.

Existem poucos trabalhos brasileiros que tem como objetivo, a determinação de fármacos em águas de rios. Com este trabalho, espera-se que a curiosidade de outros cientistas seja despertada, para que se obtenha mais informações sobre essas substâncias como poluentes.

REFERÊNCIAS

ANA. Agência Nacional de Águas. Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil, 2009.

ANDREOLI, C. V.; DALARMI, O.; LARA, A.I.; ANDREOLI, F.N.; Os Mananciais de Abastecimento do Sistema Integrado da Região Metropolitana de Curitiba - RMC. In: 9º SILUBESA - Simpósio Brasileiro De Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000, Porto Seguro. **Anais**. Porto Seguro: 2000 abr. p.196-205.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Relatório SNGPC**. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/sngpc/relatorio_2009.pdf>. Acesso em: 17/10/2014.

BAIRD, C. **Química ambiental**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002

BALLESTEROS, M. L.; MIGLIORANZA, K. S. B.; GONZALEZ, M.; FILLMANN, G.; WUNDERLIN, D. A.; BISTONI, M.A. Multimatrix measurement of persistent organic pollutants in Mar Chiquita, a continental saline shallow lake. **Science of The Total Environment**. 490, p. 73-80, 2014.

BARANOWSKA, I.; KOWALSKI, B. The Development of SPE Procedures and an UHPLC Method for the Simultaneous Determination of Ten Drugs in Water Samples. **Water Air Soil Pollut**, v 216, p. 417- 425, 2009.

BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova** , v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

BENNET, J. E. **Antimicrobial agents: antifungal agents**. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11.ed. New York: MacGrawHill, 1996. cap.49, p.411-439.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**. V. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.

BIRCH, G. F.; DRAGE, D. S.; THOMPSON, K.; EAGLESHAM, G.; MUELLER, J. F. Emerging contaminants (pharmaceuticals, personal care products, a food additive and pesticides) in waters of Sydney estuary, Australia. **Marine Pollution Bulletin**, v.97, p. 56–66, 2015.

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ZANELLA, R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.

COSTA, E. R. H. Melhoria da qualidade da água tratada e aumento da capacidade de etas através da escolha adequada de coagulantes e auxiliares, em águas com alcalinidade alta (Estudo de Caso), (2007). p. 1-8. Disponível em <<http://www.abes-dn.org.br/eventos/abes/24cbes/exemplo.doc>>. Acesso em Junho de 2014.

DAI, G.; WANG, B.; HUANG, J.; DONG, R.; DENG, S.; YU, G. Occurrence and source apportionment of pharmaceuticals and personal care products in the Beiyun River of Beijing, China. **Chemosphere**, n. 119, p. 1033–1039, 2015.

DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change, **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 907-938, 1999.

DRUGBANK. **Drug e drug target database**. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 011/09/2014.

DZIEWECZYNSKI, T. L.; HEBERT, O. Fluoxetine alters behavioral consistency of aggression and courtship in male Siamese fighting fish, *Betta splendens*. **Physiology & Behavior**, v. 107, p. 102-107, 2012.

FENSTAD, A. A.; JENSSEN, B. M.; MOE, B.; HANSSEN, S. A.; BINGHAM, C.; HERZKE, D.; BUSTNES, J. O.; KROKJE, A. DNA double-strand breaks in relation to persistent organic pollutants in a fasting seabird. **Ecotoxicology and Environmental Safety**.V.106, p. 68-75, 2014.

FENT, K.; WESTON, A.A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, p. 122-159, 2006.

FERNÁNDEZ. C.; GONZÁLEZ-DONCEL, M.;CARBONELL, J. G.; TARAZONA, J.V. Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the henares-jarama-tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. **Science of the Total Environment**, v. 408, p.543–551, 2010.

FORTE, E. B. Perfil de consumo dos medicamentos psicotrópicos na população da Caucaia. Monografia apresentada a Escola de Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Assistência Farmacêutica. Fortaleza, Ceará, 2007.

FRANZELLITTI, S.; BURATTI, S.; CAPOLUPO, M.; DU, B.; HADDAD, S. P.; CHAMBLISS, C. K.; BROOKS, B. W. FABBRI, E. An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 14-26, 2014.

GAFFNEYA, V. J.; CARDOSO, V. V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, p. 138-139, 2014.

GARCÍA-GALÁN, M, J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC–MS/MS). **Talanta**, V.81, p. 355–366, 2010.

GARRISON, V. H.; MAJEWSKI, M. S.; FOREMAN, W. T.; GENUALDI, S. A. MOHAMMED, A.; SIMONICH S. L. M. Persistent organic contaminants in Saharan dust air masses in West Africa, Cape Verde and the eastern Caribbean. **Science of The Total Environment**. 468-469, p. 530-543, 2014.

GAW, S.; THOMAS, K. V.; HUTCHINSON, T. H. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. **Royal Society**, v. 19, p.572, 2014.

GIORDANO, G. **Tratamento e controle de efluentes industriais**. Rio de Janeiro: Departamento de Engenharia Sanitária e Meio Ambiente da UFRJ, p. 218-229, 1999.

GROS, M. PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and waste waters. **Talanta**, v.70, p.678–690,2006.

GUI, G.; YU, R.; HE, X.; TU, Q.; CHEN, L.; WU, Y. Bioaccumulation and biomagnification of persistent organic pollutants in Indo-Pacific humpback dolphins (*Sousa chinensis*) from the Pearl River Estuary, China. **Chemosphere**. 114, p. 106-113, 2014.

HAZEILTON, P. D.; DU, B.; HADDAD, S. P.; FRITTS, A. K.; CHAMBLISS, C. K.; BROOKS, B. W.; BRINGOLF, R. B. Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 27-35, 2014.

HENNION, M.C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 3 – 54, 1999.

HILTON, M.J.; THOMAS, K.V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr**, v. 1015, p. 129-141, 2003.

IAP. INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ - Monitoramento da qualidade das águas dos rios da Região Metropolitana de Curitiba, no período de 2002 a 2005. 2005. Disponível em: < www.pr.gov.br/meioambiente/iap> Acesso em: 27/09/14.

JOSS, A.; KELLER, E.; ALDER A. C.; GÖBEL, A.; McARDELL, C. S.; TERNES, T.; SIEGRIST, H. Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. **Water Research** , v. 39, p. 3139-3152, 2005.

KHETAN, S.K.; Collins, T. J. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. **Chemical Reviews**. v.107, p. 2319-2364, 2007.

KIERSCH, K.; JANDL, G.; MEISSNER, R.; LEINWEBER, P.; Small scale variability of chlorinated POPs in the river Elbe floodplain soils (Germany). **Chemosphere**. v. 79 p. 745-753, 2010.

KOSJEK, T.; HEATH, E.; KRBAVCIC, A.; Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. **Environment International**, v. 31, n. 5, p. 679-685, 2005.

KOSTOPOULOU, M.; NIKOLAOU, A. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. **Trends in analytical Chemistry**, v. 27, p. 1023-1035, 2008.

KOT-WASIK, A.; DEBSKA , J.; NAMIESNIK, J. Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 557-568, 2007.

KYMMERE, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 311–320, 2004.

LACEY, C.; McMAHON, G.; BONES, J.; BARRON, L.; MORRISSEY, A.; TOBIN, J. M. An LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. **Talanta**, v.75, p. 1089–1097, 2008.

LAJEUNESSE, A.; GAGNON, C.; SAUVE, S. Determination of basic antidepressants and their N-Desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Anal Chem.**, v. 80, p. 5325-5333, 2008.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Paulo: Editora Rima, 2004.

LARANJEIRA, R. O uso racional de Medicamentos Psicotrópicos no Brasil. Departamento Psiquiatria – **Escola Paulista de Medicina Universidade Federal de São Paulo**. 8 Dezembro, 2013.

LE, T. T. Y.; RIJSDIJK, L.; SURES, B.; HENDRIKS, A. J. Accumulation of persistent organic pollutants in parasites. **Chemosphere**.108, p. 145-151, 2014.

MENEGATTI, R.; FRAGA. C. A. M.; BARREIRO E. J. A importância da síntese de fármacos. **Química Nova**, n. 3, p. 16, 2001.

LIU, R.; ZHOU, J. L.; WILDING, A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1022, p. 179-189, 2004.

MAGNÉR, J.; FILIPOVIC, M.; ALSBERG, T. Application of a novel solid-phase-extraction sampler and ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for determination of pharmaceutical residues in surface sea water. **Chemosphere**, v. 80,p. 1255–1260, 2010.

METCALFE, C. D.; KOENIG, B. G.; BENNIE, D. T.; SERVOS, M.; TERNES, T. A.; HIRSCH, R. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. Environmental, **Toxicology and Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 2872-2880, 2003.

NAKADA, N.; TANISHIMA, T.; SHINOJARA, H.; KIRI, K.; TAKADA, H. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. **Water Research**, v. 40, p. 3297–3303, 2006.

NEBOT, C; Gibb, S. W., Boyd, K. G. Quantification of human pharmaceuticals in water samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, p. 87–94, 2007.

NOGUEIRA N. M.; SOARES, B. T. M.; ANDRADE, A. B. N.; SINGH, A. K.; Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada. **Rev. Bras.Farm.**, v. 92, p. 44-50, 2011.

ONESIOS, K. M.; YU, J. T.; BOUWER, E.J. Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: a review. **Biodegradation**, v. 20, p. 441–466, 2009.

PAVLOVIĆ, D. M.; BABIC, S.; HORVAT, A. J. M.; KASTELAN-MACAN, M. Sample Preparation in analysis of pharmaceuticals. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 26, p. 1062-1075, 2007.

PETROVIĆ, M.; HERNANDO, M. D.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A** , v. 1067, p. 1-14, 2005.

PHILIPPI JR. A. **Saneamento, saúde e ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável**. Barueiri-SP: Manole, 2005.

POI, C. D.; BIDEL, F.; DICKET, L.; BELLANGER, C. Cryptic and biochemical responses of young cuttlefish *Sepia officinalis* exposed to environmentally relevant concentrations of fluoxetine. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 36-45, 2014.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova** , v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHARDSON, S.D. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 4295–4324, 2007.

ROZENFELD, S; RANGEL I. T. M. —A Farmacovigilância. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 4, n. 3, p. 336-341, 1998.

SANCO, COMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Document nº SANCO/10684/2009. **Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. Uppsala, Suécia. 01/01/2010.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 4, p. 665-676, 2011.

SODRÉ, F.F.; LOCATELLI, F. A. F.; JARDIM, W. F. Occurrence of Emerging Contaminants in Brazilian Drinking Waters: A Sewage-To-Tap Issue. **Water Air Soil Pollut**, V. 206, p. 57–67, 2010.

STEENE, J.; LAMBERT, W. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1182, p.153–160, 2008.

STUMPF, M.; TERNES, T. A.; WILKEN, R. D.; RODRIGUES, S. V.; BAUMANN W.. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135-141, 1999.

SUCHARA, E. A. **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para Determinação De Fármacos Em Fluídos Biológicos E Amostras Ambientais Através de Cromatografia Líquida e Gasosa**. 2007. 4 p. Tese (Doutorado em Química) - UFSC, Florianópolis, SC.

SUCHARA, E. A.; BUDZIAK, D.; MARTENDAL, E.; COSTA, L. L.; CARASEK, E. A combination of statistical and analytical evaluation methods as a new optimization strategy for the quantification of pharmaceutical residues in sewage effluent. **Analytica chimica acta** ,v. 613, p. 169–176, 2008.

SUMPTER, J. P.; DONNACHIE, R. L.; JOHNSON, A. C. The apparently very variable potency of the anti-depressant fluoxetine. **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 57-60, 2014.

TAMBOSI, J. L. Recent research data on the removal of pharmaceuticals from sewage treatment plants (STP). **Química Nova**, v. 33, p. 1-10, 2010.

TAUXE-WUERSCH, A.; DEALENCASTRO, L. F.; GRANDJEAND, D.; TARRADELLAS, J. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. **Water Research**, v. 39, p. 1761-

1772, 2005.

TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R. D.; SERVOS, M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **The Science of the Total Environment**, v. 225, p. 81-90, 1999.

TESSARO, P. R.; ZANCANARRO, V. Recolhimento e descarte dos medicamentos das farmácias caseiras no município de Caçador-SC. **Saúde Meio Ambiente**. v. 2, p. 118-128, 2009.

THOMAS, K. V.; HILTON, M. J. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 436-444, 2004.

VARGA, R.; SOMOGYVARI, I.; EKE, Z.; TORKOS, K. Determination of antihypertensive and anti-ulcer agents from surface water with solid-phase extraction–liquid chromatography–electro spray ionization tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 83, p.1447–1454, 2011.

WEINBERGER, J.; KLAPER, R. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). **Aquatic Toxicology**, v. 151, p. 77-83, 2014

VOGT, A. I.; GOLSCHIMIDT JUNIOR, J. L.; GODOY, L. P.; BADKE, M. R. T. Uso de indicadores ambientais no monitoramento da qualidade do efluente final em uma estação de tratamento de esgotos. AEPRO – Associação Brasileira de Engenharia de Produção. **Revista Engenharia de Produção**, n. 204, 1998.

VULLIET, E. OLIVÉ, C. C.; LOUSTALOT, M. F. G. Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface Waters. **Environ Chem Lett**, 2009.

WANAMOKI, P. M.; DEVARAJAN, N.; THEVENON, F.; BIRANE, N.; ALENCASTRO, L. F.; GRANDJEAN, D.; MPIANA, P. T.; PRABAKAR, K.; MUBEDI, J. L.; KABELE, C. G.; WILDI, W.; POTÉ, J. Trace metals and persistent organic pollutants in sediments from river-reservoir systems in

Democratic Republic of Congo (DRC): Spatial distribution and potential ecotoxicological effects. **Chemosphere**. v. 111, p. 485-492, 2014.

WEIGEL, S.; BERGER, U.; JENSEN, E.; KALLENBORN, R.; THORESEN, H.; HÜHNERFUSS, H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. **Chemosphere** , v. 54, p. 583-592, 2004.

WU, J.; QIAN W.; YANG, Z.; ZHANG, L. Study on the matrix effect in the determination of selected pharmaceutical residues in seawater by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography–electrospray ionization low-energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 1471–1475, 2010.

ZHANG Z.L.; ZHOUL J.L. Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 205–213, 2007.